

Die Funktion des Ribosylthymins in
Transfer-RNA bei der Codon-Anticodon-Erkennung
und der Initiation der Proteinbiosynthese
in Eubakterien

von
Rosemarie Praisler
aus Erlangen

Diss. Erlangen
1984

1984 #246

**Die Funktion des Ribosylthymins in
Transfer-RNA bei der Codon-Anticodon-Erkennung
und der Initiation der Proteinbiosynthese
in Eubakterien**

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades**

**vorgelegt von
Rosemarie Praisler
aus Erlangen**

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

21.5.1984

Vorsitzender der Promotionskommission:

Prof. Dr. ~~H. Korn~~ ^{K. Jacob}

Erstberichterstatte:

Prof. Dr. H. Kersten

Zweitberichterstatte:

Prof. Dr. E. Schweizer

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof.Dr.H. Kersten
- Arbeitsgruppe Biochemie-
Fachbereich Biologie/Chemie
an der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546208_0044

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
1 A ₂₆₀	ist die Menge eines Stoffes in 1 ml Lösung, die bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Lichtweg von 1 cm die Absorption 1 zeigt
AA-tRNA	Aminoacyl-tRNA
A-Seite	Akzeptorseite, Bindungsstelle für AA-tRNA am Ribosom
ATP	Adenosintriphosphat
β-Me	β-Mercapto-Ethanol
C	Cytidin
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
D	Dihydrouridin
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl-Cellulose
Dimethyl-POPOP	1,4-Di-(2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-benzol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EF-G	Elongationsfaktor G
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
fMet	Formyl-Methionin
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	(N-2-hydroxyäthylpiperazin-N -2-äthansulfonsäure)-Na-Salz
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IF-1,2,3	Initiationsfaktor 1,2,3
Leu	Leucin
Lys	Lysin

M	Molar
Met	Methionin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Ψ	Pseudouridin
Phe	Phenylalanin
Poly(A)	Polyadenylsäure
Poly(Phe)	Polyphenylalanin
Poly(U)	Polyuridylsäure
P-Seite	Peptidylseite, Bindungsstelle der Peptidyl-tRNA am Ribosom
ppGpp	Guanosintetraphosphat (Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
rel ⁺ /rel ⁻	Stamm mit/ohne strenge Kontrolle der Protein- und RNA-Synthese
RNAase	Ribonuklease
RPC	Reversed Phase Chromatography
S	Sedimentationseinheit
30S/50S	ribosomale Untereinheit mit der Sedimentations- konstante 30S/50S
70S	Prokaryontisches Ribosom der Sedimentations- konstante 70S
S-100	Überstand einer Zentrifugation mit 100 000 g
SAM	S-Adenosylmethionin
T (m ⁵ U)	Ribosylthymin (5-Methyluracil)
TCA	Trichloressigsäure
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylmethylen-diamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
trmA ⁺ /trmA ⁻	Stamm mit/ohne tRNA-Uracil-5- Methyltransferase
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uridin

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	4
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Material	12
3.2	Bakterienstämme und Bakterienzüchtungen	15
3.3	Zellaufschlüsse	16
3.4	Präparation von Gesamt-tRNA	17
3.5	Analytische RPC-5 Chromatographie	17
3.6	Enzymextrakte und enzymatische Tests	18
3.6.1	Aminoacylierungs-Suchtest	18
3.6.2	Formylierungsansatz	20
3.6.3	Methylierungsansatz	21
3.7	Bausteinanalyse der tRNA	22
3.7.1	P ₁ -Verdauung	22
3.7.2	HPLC-Nukleosidanalyse	22
3.7.3	Ein-Dimensionale Gelelektrophorese	23
3.7.4	Isolierung der tRNA aus dem Gel	24
3.8	Hybridisierungsansatz	24
3.9	Isolierung von Zellbestandteilen	25
3.10	Poly(U) abhängige Peptidbiosynthese	30
3.11	Bindungsversuche mit Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten	31
4	ERGEBNISSE	33
4.1	Einfluß von T auf Elongation und Genauigkeit	34
4.1.1	Trennung und Anreicherung der tRNA-Leucin-Isoakzeptoren	34
4.1.2	Elongation der Proteinbiosynthese in vitro	38
4.1.3	Einfluß von Polyaminen	38
4.1.4	Untersuchungen zur Codon-Anticodon-Wechselwirkung	43
4.1.5	Geschwindigkeit der Elongation	48

4.2	Einfluß von I auf die Initiation der Proteinbiosynthese	52
4.2.1	Bindung der Initiations-tRNA an die AUG programmierte 30 S Untereinheit	54
4.2.2	Bindung der Initiations-tRNA an das 70 S Ribosom	58
4.2.3	Charakterisierung der spezifischen Methionin-tRNA	61
4.2.4	Methylierung der tRNA ^{fMet}	61
4.2.5	HPLC-Analyse der Nukleoside von ¹⁴ C-Methyl- markierter tRNA ^{fMet}	61
4.2.6	P ₁ -Verdauung und zweidimensionale Dünnschicht- Chromatographie der Nukleoside der tRNA ^{fMet}	65
4.2.7	Eindimensionale Gelelektrophorese	66
4.3	Untersuchungen über die Methylierung von U54 zu T54 in Elongations- und Initiations-tRNAs	69
4.3.1	Methylierungen mit Enzymextrakten aus E.coli CP 79	69
4.3.2	Methylierungen mit tRNA-Uracil-5-Methyltransferase	73
4.3.2.1	Einfluß von IF-2 auf die Methylierung	73
4.3.2.2	Hemmung der Methylierung von I-defizienter Initiations-tRNA durch Elongations-tRNAs	75
5	DISKUSSION	78
6	LITERATUR	87

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluß der Modifikation Ribosylthymine (T), das in prokaryontischen tRNAs an Position 54 vorkommt, mit Hilfe von E.coli TrmA-Mutanten bei der Proteinbiosynthese untersucht. Ein den zellulären Verhältnissen angepaßtes, polyaminabhängiges System ermöglichte es, feine Änderungen auf die Elongation und die Genauigkeit der Proteinbiosynthese durch diese tRNA-Modifikation zu messen.

Im wesentlichen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Ribosylthymine in Elongations-tRNAs von E.coli

Bei Untersuchungen über den Einfluß von Polyaminen verschiedener Kettenlänge auf die von Polyuridylsäure gesteuerte Synthese von Polyphenylalanin zeigte sich, daß die Molekülkettenlänge (insgesamt 9 C- und N-Atome) wesentlich ist. Das Poly(U)Poly(Phe)System ist abhängig von Spermidin, wohingegen Putrescin nur stimulierend auf die Polypeptidsynthese wirkt.

Die Geschwindigkeit der Poly(Phe)Synthese und die Menge an gebildetem Polyphenylalanin ist abhängig vom T-Gehalt der tRNAs. Werden T-defiziente und T-haltige Gesamt-tRNAs in unterschiedlichem Verhältnis "in vitro" eingesetzt, so ist die Geschwindigkeit der Elongation um so größer, je höher der Anteil der T-haltigen Gesamt-tRNA im tRNA-Gemisch ist.

Der Fehleinbau von Leucin in Polyphenylalanin an Poly(U) programmierten Ribosomen wurde durch Ribosylthymine in der tRNA dahingehend beeinflußt, daß mit T-haltiger Gesamt-tRNA deutlich weniger Fehler auftraten, als mit T-defizienter Gesamt-tRNA. Am Fehleinbau von Leucin waren nicht alle fünf tRNA-Leucin-Isoakzeptoren in gleicher Weise beteiligt. Es konnte gezeigt werden, daß nur der tRNA₄^{Leu}-Isoakzeptor (Anticodon XAA) Fehleinbau von Leucin in Polyphenylalanin verursachte.

2. Ribosylthymine in Initiations-tRNAs von E.coli Mutanten

In optimierten polyaminabhängigen in vitro Systemen sollten die Ergebnisse früherer Arbeiten mit T- bzw. U-haltigen Initiations-tRNAs wiederholt werden. Dazu wurden die Bildungsgeschwindigkeit und die Anzahl der 30S- und 70S- Initiationskomplexe gemessen.

Prokaryonten starten die Proteinbiosynthese mit formylierter Met-tRNA^{fMet} an polycistronischer Messenger RNA. Der Formylierungsvorgang an der Initiations-tRNA ist dabei für gram-positive und gram-negative Eubakterien verschieden. Bei gram-positiven ist sowohl die Biosynthese von Ribosylthymine als auch die Formylierungsreaktion von Tetrahydrofolsäure abhängig, während bei gram-negativen Eubakterien die Methylierung von Uridin zu Ribosylthymine durch eine S-Adenosylmethionin abhängige Methyltransferase katalysiert wird.

Mit U-haltiger Met-tRNA^{fMet} von E.coli Mutantanten, die formyliert und unformyliert eingesetzt wurde, sollte geklärt werden, ob U-haltige Met-tRNA^{fMet} auch unformyliert Initiationskomplexe bilden kann, und ob die Formylgruppe sowohl bei der 30S-Initiation als auch bei der 70S Initiation an internen Startcodons polycistronischer mRNA notwendig ist.

In polyaminabhängigen Ribosomenbindungstesten mit 30S-Untereinheiten und 70S Ribosomen konnten keine signifikanten Unterschiede für Met-tRNA^{fMet} und fMet-tRNA^{fMet} aus E.coli TrmA⁺ und TrmA⁻ nachgewiesen werden.

3. In vitro Methylierung von Initiations- und Elongations-tRNAs aus TrmA⁺ und TrmA⁻ Stämmen von E.coli

Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß Initiations-tRNAs mit U an Stelle von T in zellfreien Proteinbiosynthesystemen auch unformyliert starten. Aus dem TrmA⁺ Stamm wurden daher Initiations-tRNAs isoliert und ihr Methylierungsgrad in Bezug auf T untersucht.

Es zeigte sich, daß die Initiations-tRNA aus E.coli TrmA⁺ zu 30% untermethyliert war, während die Elongations-tRNAs desselben E.coli Stammes voll modifiziert waren. Damit waren für die Ribosomenbindungsteste (siehe 2) aus TrmA⁻ und TrmA⁺ Stämmen Initiations-tRNAs eingesetzt worden mit U an Stelle von T.

Durch Gelelektrophorese wurde gefunden, daß in beiden Stämmen eine zweite tRNA^{fMet} vorkommt. Die Sequenzanalyse, durchgeführt von Dr. Kuchino in Japan ergab, daß beide tRNAs gleiche Sequenz enthalten. Der tRNA^{fMet}₂ fehlt partiell T an Position 54 und s⁴U an Position 8.

tRNA-haltige S-100 Fraktionen aus E.coli CP 79 (TrmA⁺) methylierten U-54 in Elongations-tRNAs vollständig, U-54 in Initiations-tRNAs mit S-Adenosylmethionin als Coenzym nur partiell.

Nach Entfernen der endogenen tRNA aus dem Enzymrohextrakt konnten die T-defizienten Initiations-tRNAs vollständig methyliert werden.

Der Einfluß von Elongations-tRNAs auf die Methylierung der Initiations-tRNA mit gereinigter m⁵U-Methylase wurde untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- i. Zusatz von Initiations-tRNA (T54) hemmt die SAM abhängige Methylierung der U-haltigen Initiations-tRNA mit m⁵U-Methylase nicht,
- ii. Zusatz von Elongations-tRNA (T54) hemmt diese Methylierungsreaktion bis zu ca. 50%. Die Hemmung ist dabei abhängig von der Konzentration der zugesetzten Elongations-tRNA.

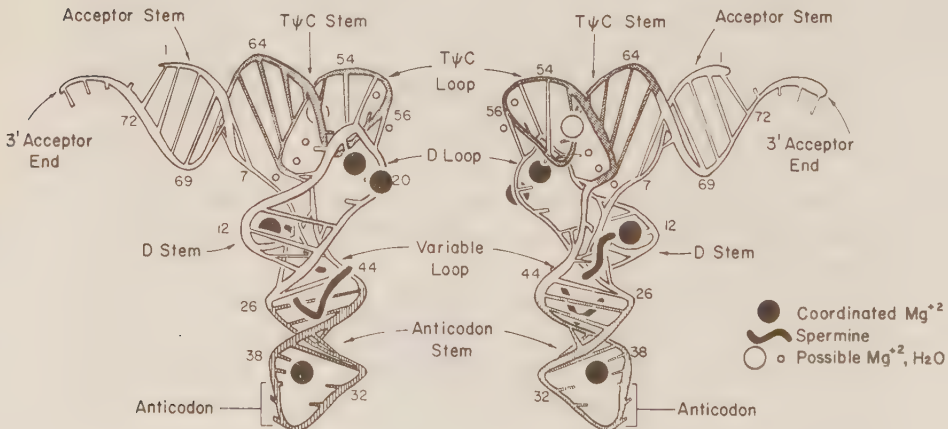
Die untersuchten E.coli Mutanten haben zwei Species von Initiations-tRNAs: tRNA^{fMet}₁ und tRNA^{fMet}₂, wobei tRNA^{fMet}₂ partiell unmodifiziert ist.

Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) sind an wesentlichen Schritten der Proteinbiosynthese beteiligt.

Als Initiations-tRNA und Aminoacyl(AA)-tRNA sind sie an Proteine gebunden, wohingegen unbeladenen tRNA normalerweise nur in sehr geringem Ausmaß in der Zelle vorkommt.

Die Sekundärstruktur ist für alle bis jetzt sequenzierten tRNAs, mit Ausnahme einiger mitochondrialer, die sogenannte "Kleeblattstruktur". Die Tertiärstruktur der tRNA wurde für tRNA^{Phe} aus Hefe durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Im Kristall bildet diese tRNA ein L-förmiges Molekül das aus zwei rechtwinklig zueinander stehenden Helices besteht (Abb. 1, Quigley, 1978). Die Konformation der tRNA ist in Lösung nicht statisch, sondern sie ändert sich i) durch Bindung an Proteine wie EF-Tu und IF-2, ii) durch Bindung an das Codon der mRNA und iii) durch Magnesiumionen und Polyamine.

Abb. 1 Tertiärstruktur der tRNA^{Phe}



An jedes tRNA-Molekül von E.coli sind zwei Moleküle Spermidin und vier Mg^{2+} -Ionen assoziiert (Cohen et al., 1969).

Bei physiologischem pH liegen die Polyamine als Kationen vor und können deshalb über Ionenbindungen an Nukleinsäuren gebunden werden.

Folgende Wechselwirkungen der Polyamine mit DNA, RNA und tRNA sind bisher bekannt:

-DNA wird durch Spermidin vor enzymatischer Hydrolyse geschützt, wobei die Tertiärstruktur stabilisiert wird. An E.coli Phagen T_4 DNA wurde zum ersten Mal die Assoziation mit Polyaminen gefunden (Ames und Dubin, 1960).

-Bei der in vitro Übersetzung von Messenger-RNA wird in Gegenwart von Polyaminen der Kettenabbruch verringert (Abraham und Phil, 1980). Die Fehlerrate in einem "in vitro" Proteinbiosynthesesystem ist in Gegenwart von Polyaminen erniedrigt (Jelenc und Kurland, 1979).

-Spezifische $tRNA^{Phe}$ läßt sich nur in Gegenwart von Polyaminen kristallisieren.

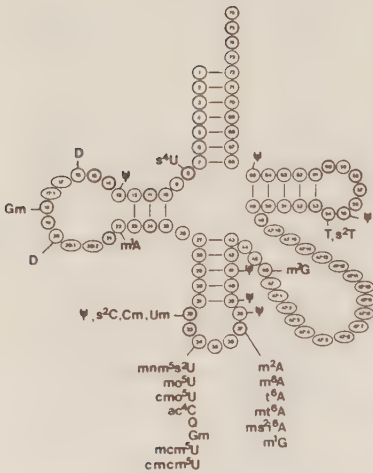
Außer an der Proteinsynthese ist die Transfer-RNA noch an weiteren Mechanismen in der Zelle beteiligt, so z.B. an der Zellwandsynthese und an Regulationsprozessen (Clark, 1978).

Die unbeladene tRNA an der ribosomalen A-Seite ist das Auslösesignal der sogenannten "stringent response", wobei ein ribosomal gebundener Faktor (stringent factor) die seltenen Nukleotide ppGpp und pppGpp synthetisiert. ppGpp bindet an die RNA Polymerase und verändert deren Promotorspezifität (Travers, 1976). Unter Aminosäuremangelbedingungen wird dadurch die Synthese von mRNA und ribosomalen Proteinen an die erniedrigte Proteinbiosynthese angepaßt.

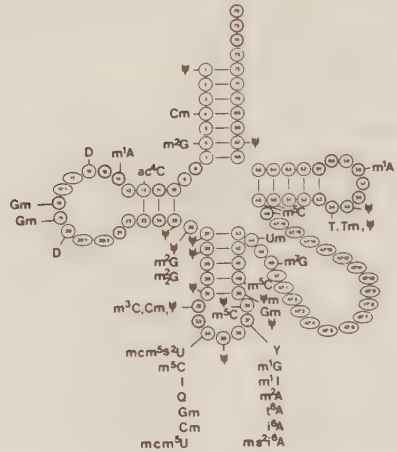
Jedes tRNA-Molekül enthält außer den vier Hauptbasen Adenin (A), Cytidin (C), Guanin (G) und Uridin (U) noch mehrere modifizierte Nukleoside, von denen inzwischen mehr als 50 bekannt sind.

Diese modifizierten Nukleoside sind vor allem methylierte Basen, z.B. 7-methyl-Guanin (m^7G), 5-methyl-Uracil (m^5U) oder an der 2'-OH-Gruppe der Ribose methylierte Nukleoside, wie 2'-O-methyl-Cytidin (Cm). Weiterhin kommen auch andere modifizierte Nukleoside vor, z.B. Dihydrouridin (D), Pseudouridin (Ψ), 6-isopentenyl-Adenosin (i^6A) und Q (7-(4,5-cis-Di-hydroxy-1-cyclopenten-3-yl-aminomethyl)- 7-deaza-guanosin. Abb. 2 zeigt die Positionen von modifizierten Nukleosiden in eubakteriellen tRNAs im Vergleich zu den eukaryontischen tRNAs.

Abb. 2 Kleeblattstruktur der tRNA - Positionen von modifizierten Nukleosiden in Eubakterien und Eukaryonten (zusammenfassende Literatur Kersten, 1982)



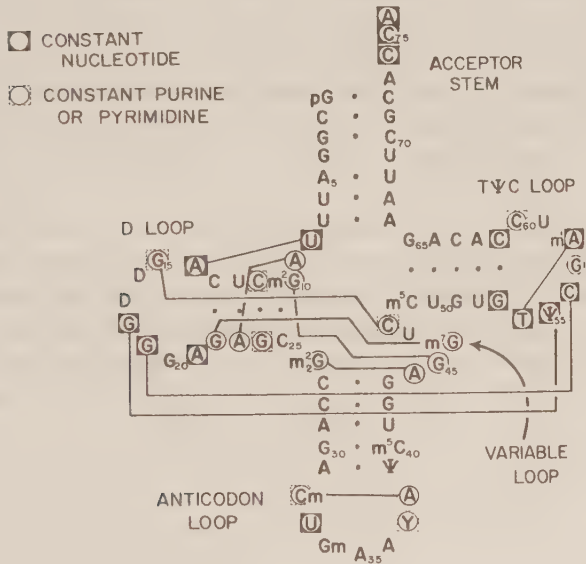
Eubacteria



Eukaryotes

Das Sekundärstrukturmodell in Abb. 3 zeigt, daß bestimmte Modifikationen sehr häufig vorkommen und immer dieselbe Position einnehmen, wobei die gleiche Modifikation an verschiedenen Positionen der tRNA durch verschiedenen Enzyme eingeführt wird. Zur Erkennung der zu modifizierenden Base durch ihre Methylase ist somit auch die Primärsequenz der Umgebung und die Tertiärstruktur der tRNA von Bedeutung. Die meisten Modifikationen (Ausnahme Q) werden am Polynukleotid, d.h. direkt nach der Polymerisation durch die RNA Polymerase noch vor dem Schneiden der Vorläufer-tRNA eingeführt (zusammenfassende Literatur Björk et al., 1983). Es ist deshalb möglich, daß Modifikationen auch eine Rolle für die Transkriptionskontrolle einiger tRNA-Gene spielen.

Abb. 3 Sekundärstrukturmodell -
Positionen von konstanten und modifizierten Nukleosiden



Die Anzahl der modifizierten Nukleoside in der tRNA nimmt im Laufe der Evolution zu. Bakterielle tRNAs besitzen ca. 5 %, Säuger-tRNAs ca. 20 % modifizierte Nukleoside. Der Gehalt an modifizierten Nukleosiden kann in den verschiedenen Zelltypen eines Organismus variieren und sich z.B. mit dem Alter oder mit veränderten Wachstumsbedingungen ändern.

Bis heute ist nur von wenigen Modifikationen die Bedeutung gesichert bewiesen:

Die Methylierung von Guanosin an Position 10 der tRNA zu 2-Methylguanosin (m^2G) der tRNA^{Phe} aus Hefe beeinflusst die Erkennung dieser tRNA durch ihre Synthetase (Roe et al., 1973).

Modifizierung von Uridin in der ersten Position des Anticodons (wobble Position) zu 2-Thio-Uridin verändert die möglichen Basenpaarung: unmodifiziertes Uridin kann entsprechend der "wobble-Hypothese" von Crick (1966) sowohl mit Adenosin als auch mit Guanosin basenpaaren; modifiziertes Uridin nur noch mit Guanosin (Yoshida et al., 1970).

Ribosemethylierungen scheinen die tRNA gegen Ribonukleasen zu schützen (Agris et al., 1973), indem sie die Spaltung der angrenzenden Phosphodiesterbindung verhindern.

Regulationsfunktion einer Modifikation ist für die His T Mutante aus *Salmonella typhimurium* beschrieben (Singer et al., 1972). Diese Mutante besitzt eine defekte Pseudouridinsynthetase, wodurch im Anticodonstamm ein unmodifiziertes Uridin an Stelle eines Pseudouridins auftritt. Dadurch wird die Regulation von Aminosäureoperons gestört, da diese untermodifizierte tRNA nicht mehr als Corepressor des Histidinoperons fungieren kann.

Die Funktion der Hypermodifikation Q in der ersten Position des Anticodons einiger tRNAs wird zur Zeit besonders intensiv untersucht. In tRNAs aus Tumorgewebe wurde ein veränderter Q-Gehalt gefunden, verglichen mit tRNAs aus gesunden Zellen; ebenso ändert sich der Q-Gehalt dieser tRNAs bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (Brisoe et al., 1975; Katze, 1975).

Verschiedene Modifikationen der tRNA wurden bisher und werden noch im Arbeitskreis von H. Kersten hinsichtlich ihrer Funktion und Bedeutung bei Regulationsprozessen untersucht:

m⁷G: Aschhoff et al., 1976; rI: Schmidt et al., 1976; Dingermann et al., 1977 und 1980; Kersten et al., 1981; m⁵U, cm⁵U: Albani et al., 1976; i⁶A, ms²i⁶A: Arnold et al., 1977.

Eine hochkonservierte Modifikation ist Ribosylthymin an Position 54 der tRNA.

Die Sequenz GTΨC spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Bindung der tRNA in die ribosomale A-Seite (Ofengand und Henes, 1969). Das Fragment GTΨCG kann an komplementäre Sequenzen der 5S rRNA gebunden werden (Erdmann et al., 1973) und hemmt dann die Bindung einer aminoacylierten tRNA an das Ribosom (Richter et al., 1974).

Mit Hilfe von E.coli Mutanten, denen die tRNA-m⁵U-Methylase fehlt, können Funktionen von Ribosylthymin "in vitro" untersucht werden. Für den E.coli Wildtyp ist Ribosylthymin in der tRNA ein Überlebensvorteil, wie es in Mischkulturen gezeigt werden konnte. Nach ca. 22 Verdoppelungen ist die T-defiziente Mutante nicht mehr nachweisbar.

Bei der Proteinbiosynthese werden zwei Arten von tRNA verwendet - Initiations-tRNA und Elongations-tRNAs. Elongations-tRNAs sind an folgenden Schritten der Proteinbiosynthese beteiligt:

i) aminoacylierte tRNA wird als ternärer Komplex AA-tRNA x EF-Tu x GTP an die A-Seite des Ribosoms gebunden.

ii) über codonabhängige Anticodonbindung der tRNA wird die richtige Aminosäure zur Kettenverlängerung bereitgestellt. Diese beiden Schritte determinieren u.a. die Geschwindigkeit sowie die Genauigkeit bei der Proteinbiosynthese. Mit Hilfe von T-defizienten Elongations-tRNAs aus E.coli Mutanten kann die Funktion von Ribosylthymine bei beiden Vorgängen - Geschwindigkeit und Genauigkeit - untersucht werden.

In früheren Experimenten konnte bei der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese kein Unterschied bei Verwendung T-haltiger und T-defizienter tRNAs gefunden werden. Das Proteinbiosynthesesystem war zu unempfindlich, um die Auswirkung feiner Unterschiede in der tRNA messen zu können. Kurland und Jelenc (1979) entwickelten ein sensitiveres System, das durch Erniedrigung der Magnesiumkonzentration auf 5 mM und den Zusatz von Polyaminen (Spermidin und Putrescin) sowie Calciumionen, den Verhältnissen in der Zelle besser angepaßt wurde.

Dieses optimierte polyaminabhängige Homopeptidsynthesesystem wurde in dieser Arbeit verwendet, um mit Hilfe von T-defizienten tRNAs die Rolle von Ribosylthymine bei der Elongation zu untersuchen. Vor allem sollte geklärt werden, ob diese Modifikation eine Auswirkung auf die Fehlerrate bei der Proteinbiosynthese hat und ob für den fehlerhaften Einbau einer Aminosäure alle tRNA-Isoakzeptorspecies für diese Aminosäure gleichwertig verwendet werden.

Als Initiations-tRNA wird bei Prokaryonten formylierte tRNA^{fMet} verwendet. Diese Initiations-tRNA bildet im Komplex mit dem Initiationsfaktor IF-2, der mRNA und der ribosomalen 30S Untereinheit den sogenannten 30S-Initiationskomplex.

Bei Prokaryonten erfolgt die Initiation immer mit formylierter tRNA^{fMet} an polycistronischen Messengern, wohingegen Eukaryonten unformyliert an monocistronischen Messengern die Proteinbiosynthese starten. Die prokaryontischen Initiations-tRNAs enthalten die konservierte Sequenz TΨC, die eukaryontischen Initiations-tRNAs enthalten meist Adenin oder Pseudouridin an Stelle von Ribosylthymine (Roe et al., 1976; Gosh et al., 1982).

Bei den Prokaryonten scheint die Formylierung der Initiations-tRNA zur Unterscheidung der Startcodons verschiedener Cistrons von den internen AUG-Codons nötig zu sein.

Unformylierte Initiation bei Prokaryonten kann ermöglicht werden, wenn z.B. bei *B.subtilis* durch Trimethoprim die Folatreduktase gehemmt wird (Arnold et al., 1977), oder folatabhängiger *Streptococcus faecalis* in folatfreiem Medium gezüchtet wird (Rabinowitz et al., 1974).

In beiden Fällen haben die Transfer-Ribonukleinsäuren statt Ribosylthymine ein unmodifiziertes Uridin an Position 54.

Bei beiden gram-positiven Organismen ist die Biosynthese von Ribosylthymine und die Übertragung der Formylgruppe auf die Initiations-tRNA vom gleichen Coenzym, der Tetrahydrofolsäure, abhängig.

In gram-negativen Prokaryonten (*E.coli*) wird bei der Synthese von Ribosylthymine die Methylgruppe durch eine S-Adenosylmethionin abhängige Methyltransferase auf Uridin übertragen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle Ribosylthymine bei der für Prokaryonten notwendigen Formylierung der Initiations-tRNA spielt, oder anders ausgedrückt: kann unformylierte Initiation nur mit U-haltiger tRNA^{fMet} durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sollten ebenfalls in polyaminabhängigen Systemen durchgeführt werden.

Die Methylierung von U54 zu T54 ist in gram-positiven und gram-negativen Prokaryonten von zwei verschiedenen Enzymsystemen abhängig. Die tRNA-Uracil-5-Methyltransferase von *E.coli* steht im Gegensatz zu sieben weiteren Methyltransferasen unter "strenger Kontrolle" (Ny et al., 1980), d.h. bei Aminosäuremangel wird die Messenger RNA-Synthese für diese Methyltransferase reduziert.

Die im ersten und zweiten Teil dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ließen vermuten, daß in den verwendeten T-haltigen Mutanten die Elongations-tRNAs in Bezug auf Ribosylthymine voll modifiziert waren, nicht aber die Initiations-tRNAs. Deshalb sollte im dritten Teil dieser Arbeit die Ursache für die Unterschiede im Ausmaß der Methylierung von U54 zu T54 bei Initiations- und Elongations-tRNAs untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden im "pro analysi" Reinheitsgrad von der Firma E. Merck, Darmstadt, bezogen. Käufliche Nukleotide, Enzyme und Gesamt-tRNA aus E.coli MRE 600 stammten von der Firma Boehringer, Mannheim.

Enzyme:

Boehringer, Mannheim
Worthington, Freehold, USA

Nuklease P_1
RNase T_1

Chromatographiematerialien:

Boehringer, Mannheim
Merck, Darmstadt
Schleicher und Schüll, Dassel

BD-Cellulose
Cellulose Dünnschichtplatten
Glasfaserfilter GF/A
Cellulosenitratfilter BA 85

Ashland Chemical Co., Columbus
Ohio, USA

Adogen 464

Eastman Kodak Company,
Rochester, USA

X-OMAT AR Filme

Pharmacia, Uppsala, Schweden
Whatman, England

Sephadex (alle Typen)
DEAE Cellulose DE 32 und DE 52

Radioaktive Substanzen wurden von "The Radiochemical Centre", Amersham,-U.K., bezogen. Die gewünschten spezifischen Radioaktivitäten wurden im Labor durch Verdünnen mit den entsprechenden "kalten" Substanzen eingestellt.

3.1.2 Chromatographiezubehör

Die Säulenchromatographien wurden in Kühlmantelsäulen der Firma Labor-Center, Erlangen, durchgeführt. Die Gradienten wurden mittels eines Heidolph-Gradientenmischers hergestellt und mit Perpex-Pumpen (LKB-Producer AB, Bromma, Schweden) bei konstantem Durchfluß durch die Säule geleitet. Nicht lineare Gradienten wurden mittels eines LKB 11300 Ultrograd Gradientenmischers hergestellt. Die Elution wurde über die UV-Absorption der Substanzen bei 254 nm mit Geräten der Firma LKB verfolgt (Uvicord S, ausgerüstet mit Einkanalschreiber) und die Fraktionen mit einem Ultro rac-Fraktionssammler (LKB) gesammelt, der in einer Colora-Kühltruhe aufgestellt war.

3.1.3 UV-Spektralphotometer

Die optische Dichte von Bakteriensuspensionen wurde in einem Spektralphotometer (Eppendorf) mit Streulichtaufsatz bei 578 nm bestimmt. Die Absorption von tRNA-Lösungen und Ribosomen wurde bei 260 nm, die Proteinkonzentration bei 595 nm in einem Zeiss-Photometer, PMQ III, gemessen. Kontinuierliche Spektren wurden an einem Shimadzu, Double Beam Spektralphotometer, UV-210 A, aufgenommen.

3.1.4 Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivität von Proben wurde in Tricarb-Flüssigkeits-Scintillationszählern der Firma Packard (Modelle 3385 und 2660) gemessen. Die Scintillatoren PPO und Dimethyl-POPOP wurden von der Firma Zinsser, Frankfurt, geliefert.

Die Scintillatorlösungen hatten folgende Zusammensetzung:

i) feste Proben(Filterplättchen):

Toluolscintillator:

5 g PPO und 0.3 g Dimethyl-POPOP in 1l Toluol

ii) flüssige, wässrige Proben(geringe Mengen):

Toluol-Triton-X-Scintillator:

30% Triton-X in Toluolscintillatorflüssigkeit

Für die Fluorographie wurden Folienfilme der Firma Kodak verwendet. Vor der Fluorographie wurden die Chromatogramme mit einer Lösung von 7% PPO in Äther übergossen.

3.2 Bakterienstämme und Bakterienzüchtungen

Der E.coli K 12 Stamm, E.coli CP 79 (his^- , thr^- , leu^- , arg^- , $thia^-$, $relA$) und seine Mutante E.coli IB 5 ($relA$ $TrmA^-$) waren Geschenke von Dr. Björk, Universität Umea, Schweden. Der E.coli MRE 600 ($RNase^-$) stammte aus der Sammlung des Instituts.

Bakterien der Stämme E.coli CP 79, E.coli IB 5 und E.coli MRE 600 wurden in einem 20 l fassenden Fermenter der Firma Eschweiler, Kiel, gezüchtet. Zur Ernte wurde die Bakteriensuspension durch ein Kühlbad geleitet und in einer Cepa-Durchlaufzentrifuge sedimentiert.

Transfer-Ribonukleinsäuren wurden aus Zellen isoliert, die in Minimalmedium gezüchtet und Anfang stationärer Phase geerntet worden waren.

Enzymextrakte, spezifische Faktoren und Ribosomen stammten aus E.coli MRE 600, der im Maximalmedium bis zur logarithmischen Phase ($0.5 A_{260}$) gewachsen war.

Das Maximalmedium für E.coli MRE 600 setzte sich zusammen aus:

8 g	Lab lembco powder	
5 g	Pepton	
5 g	NaCl	pro Liter.

Das Minimalmedium für E.coli CP 79 und E.coli IB 5 enthielt folgende Bestandteile pro Liter (Vogel und Bonner, 1956):

MgSO ₄ × 7 H ₂ O	pH 7.0	0.2 g
Zitronensäure		2.0 g
K ₂ HPO ₄ × H ₂ O		12.6 g
NaNH ₄ HPO ₄ × 4 H ₂ O		3.5 g
Glukose		2.0 g

Zusätzlich:

Thiamin 1.0 mg

Aminosäuren: Arg, His, Leu, Thr, Val, Ileu je 100 mg

Die Glukose wurde separat gelöst und erst nach der Sterilisation (120°C, 30 Min.) dem Medium zugesetzt.

3.3 Zellaufschlüsse

Von den verschiedenen möglichen Arten Bakterienstämme aufzuschließen, wurden für die Isolierung der einzelnen Zellbestandteile folgende Aufschlußmethoden gewählt:

Aufschluß mit:

Isolierung von:

Phenol/SDS

Gesamt-tRNA

Alcoa

Enzyme, Ribosomen,

Spezifische Faktoren

3.4 Präparation von Gesamt-tRNA

Die Präparationsschritte wurden analog der in der Literatur beschriebenen Methoden durchgeführt (Zübay G., 1961; Doi R.H., 1971; Avital S., 1969). Zur Reinheitsprüfung wurde von der präparierten tRNA ein Absorptionsspektrum bei 235, 260 und 280 nm aufgenommen. Dabei verhalten sich bei reinen proteinfreien Präparationen die Extinktionen etwa wie 1:2:1 bei pH 7.0.

3.4.1 Isolierung spezifischer tRNAs

Spezifische tRNAs wurden durch Säulenchromatographien aus der Gesamt-tRNA abgetrennt, wobei mehrere Säulenläufe mit verschiedenen Trennprinzipien nacheinander durchgeführt werden müssen, um eine spezifische tRNA bzw. die Isoakzeptoren einer tRNA-Species zu erhalten. Die Trennungen erfolgten dabei durch Kombination von Ionenaustausch- und Verteilungschromatographie. Alle verwendeten Säulenchromatographien wurden in ihrer Reihenfolge nach in der Literatur beschriebenen Methoden durchgeführt. Änderungen sind in den Legenden zu den Elutionsprofilen im Ergebnisteil beschrieben.

3.5 Trennung von tRNA im analytischen Maßstab

Gesamt-tRNA wurde auf eine blasenfrei gefüllte RPC-5 Säule aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten von 0.3 M bis 0.8 M NaCl-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in kleinen Fraktionen automatisch gesammelt, wobei das Elutionsprofil kontinuierlich von einem Transmissions- bzw. Extinktionsschreiber aufgezeichnet wurde. Das optische Profil allein erlaubte zunächst keine Aussage, an welcher Position die zu isolierende tRNA eluiert wurde. Die gesuchte tRNA konnte in den Fraktionen auf Grund ihrer Eigenschaft, eine spezifische Aminosäure zu binden, nachgewiesen werden. Diejenigen Fraktionen, die Akzeptoraktivität zeigten, wurden vereinigt. Je nach optischer Dichte und Salzkonzentration in diesen Fraktionen konnte die tRNA direkt mit Alkohol ausgefällt werden.

3.6 Enzymatische Testsysteme

3.6.1 Aminoacylierungs-Suchtest

Die Suche nach der zu isolierenden tRNA und die Reinheitsprüfung der spezifischen tRNA erfolgte durch Aminoacylierungstests.

Die Beladbarkeit einer reinen, aktiven spezifischen tRNA beträgt stöchiometrisch 1 Mol Aminosäure pro 1 Mol tRNA. Mit Hilfe radioaktiv markierter Aminosäure kann in einem "in vitro" Aminoacylierungstest die Menge an vorliegender spezifischer tRNA gemessen werden. Die analytischen Aminoacylierungen wurden als Kinetiken durchgeführt, wobei die Reaktion verfolgt und das Reaktionsende sicher festgestellt werden konnte. Die Reaktion wurde mit der Zugabe des Synthetasengemisches (S-150) gestartet und der Ansatz sofort im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Aus einem 100 µl Reaktionsansatz wurden nach 5, 10, 15 und 20 Minuten Inkubationszeit Aliquots von je 20 µl entnommen und auf Filterplättchen (Schleicher & Schüll) pipettiert, mit 10 % TCA auf dem Filterplättchen gefällt, dreimal mit 5% kalter TCA gewaschen, einmal mit Äthanol/Äther 1:1 und einmal mit Äther (vergl. Mans und Novelli, 1961). Nach dem Trocknen der Plättchen wurden sie in Scintillationsgläsern überführt und mit 5 ml Toluolscintillator bedeckt. Die Menge der so radioaktiv markierten aminoacylierten tRNA wurde in einem Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen.

Die Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1.25 M Hepes, pH 8.0	8 µl	100 mM
250 mM Mg-acetat	4 µl	10 mM
250 mM KCl	4 µl	10 mM
100 mM ATP	2 µl	2 mM
50 uCi/ml ¹⁴ C-Aminosäure	1 µl	
0.5 mM Aminosäure	1 µl	
Gesamt-tRNA	0.1-0.5 A ₂₆₀	
Enzym (S-100) ca. 10 mg/ml Protein	10 µl	
Aqua bidest.	ad 100 µl	

Präparative Aminoacylierungen wurden analog durchgeführt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz durch Zugabe von Phenol und NaAc pH 4.5 gestoppt und die beladene tRNA durch 10-minütiges Schütteln in die wässrige Phase übergeführt. Nach Phasentrennung wurde die Phenolphase erneut gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit dem 2.5 fachen Volumen an kaltem Alkohol versetzt und die aminoacylierte tRNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach Abzentrifugieren, Trocknen und Lösen der aminoacylierten tRNA wurde diese im Poly(U) bzw. Bindungstest eingesetzt.

3.6.1.1 Umrechnung der vom Scintillationszähler erhaltenen Werte (cpm) in die Mengenangabe für spezifische tRNA (pmol)

Die vom Scintillationszähler angegebenen Zählwerte werden mit Hilfe der folgenden Formeln umgerechnet, wobei die gemessene Radioaktivität direkt proportional ist der tRNA-Menge, an die sie gekoppelt ist. Dividiert man durch die optisch ermittelte Testmenge (A_{260}), so erhält man die spezifische Akzeptoraktivität der tRNA = pmol/ A_{260} .

dpm = Radioaktive Zerfälle pro Minute

cpm = counts per minute

dpm = cpm x Zählrohrbeute

Ci = Curie, Radioaktivitätseinheit

Verdünnungsfaktor $\frac{V}{v} = \frac{\text{Ansatzvolumen}}{\text{Probenvolumen auf Filter}}$

$$1 \text{ Ci} = 2.22 \times 10^{12} \text{ dpm}$$

Umrechnung dpm in Akzeptoraktivität der tRNA

$$\frac{\text{dpm} \times V}{2.22 \times v \times \text{spez. Aktivität der Aminosäure} \times A_{260} \text{ tRNA}} = \text{pmol aa-tRNA}^{\text{aa}}/A_{260}$$

3.6.2 Formylierungsansatz

Methioninspezifische tRNA kommt in zwei verschiedenen Formen vor, eine davon ist an der Aminogruppe des Methionins formylierbar (tRNA^{fMet}), die andere nicht (tRNA^{mMet}). Zur Unterscheidung der formylierbaren Methionin-tRNA (tRNA^{fMet}) von der nicht formylierbaren (tRNA^{mMet}) wurde in einem "in vitro" Ansatz gleichzeitig die Aminoacylierung und die Formylierung der spezifischen tRNA durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog 3.6.1. Die Formylierung der tRNA wurde mit Na-acetat pH 5.3/ CuSO₄ überprüft (Schofield und Zamecnik, 1968). Dazu wurde nach 15 Minuten bei 37°C aus dem Reaktionsansatz ein Aliquot von 20 µl auf Filterplättchen pipettiert und TCA gefällt (Aminoacylierung), ein weiteres Aliquot von 20 µl wurde mit 20 µl CuSO₄ (0.2M) und 80 µl NaAc (0.2M, pH 5.3) für weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. 60 µl davon wurden ebenfalls auf Filterplättchen mit 10% TCA gefällt. Bei der Inkubation der tRNA mit CuSO₄/NaAc werden alle Aminoacylbindungen zwischen Aminosäure und tRNA gelöst, bei denen die Aminosäure nicht formyliert war. Die gemessene, TCA-gefällte Radioaktivität entsprach somit dem Anteil der formylierten aa-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}).

Die Reaktionsmischung bestand aus folgenden Komponenten:

		Endkonzentration
2 M Tris/HCl pH 7.2	20 µl	400 mM
1 M Mg-acetat	2 µl	20 mM
100 mM DTT	10 µl	10 mM
100 mM ATP	10 µl	10 mM
20 mM CTP	1 µl	0.2 mM
1 M Creatin-Phosphat	2 µl	20 mM
2mg/ml Creatinkinase	3.5 µl	
10 mM Leucovorin	1 µl	1 mM
283 mCi/mmol ¹⁴ C-Methionin	1 µl	
0.5 mM Methionin	1 µl	
tRNA	0.1-0.5 A ₂₆₀	
S-150 10 mg/ml	10 µl	
Aqua bidest. ad	100 µl	

3.6.3 Methylierungsansatz

E.coli IB 5 (TrmA^-) ist eine tRNA(Uracil-5)methyltransferase defiziente Mutante des Elternstammes E.coli CP 79 (TrmA^+). Zur Kontrolle der Untermethylierung an Position 54 der tRNA wurde für jede Bakterienzüchtung des Mutantenstammes die Gesamt-tRNA mit ^{14}C -markiertem S-Adenosylmethionin (SAM) nachmethyliert. Dabei wird stöchiometrisch ein Mol CH_3 pro Mol tRNA chemisch gebunden, wobei als Reaktionsprodukt aus Uridin Ribosylthymine entsteht. Der bei Schmidt (1977) und Raettig (1976) beschriebene Standardansatz wurde nur wenig verändert.

Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

TMMG-puffer	50 μl	
^{14}C -SAM	10 μl	
tRNA	0.1 - 0.5	A_{260}
S-150 (10mg/ml)ca.	200 μg	
aqua bidest. ad	160 μl	

TMMG-Puffer:

Triäthanolamin	pH 8.0	100 mM
2-Mercaptoäthanol		20 mM
MgCl_2		10 mM

^{14}C -SAM (Originalabfüllung) wurde mit kaltem SAM auf eine spezifische Aktivität von 10.5-10.8 mCi/mmol eingestellt.

Gestartet wurde die Reaktion mit der Zugabe des Enzymgemisches (S-150 Überstand aus E.coli MRE 600). Nach 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten Inkubation bei 37°C wurde je ein Aliquot von 25 μl entnommen und auf Filterplättchen pipettiert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie bei 3.6.1. Die gefällte, radioaktiv markierte tRNA wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Menge an eingebauter Methylgruppe in pmol $\text{CH}_3/\text{A}_{260}$ tRNA wurde analog wie in 3.6.1.1 berechnet.

3.7 Bausteinanalyse der tRNA

3.7.1 P_1 -Verdauung zu pN und Nukleotidtrennung nach Silberklang (1979)

0.5 - 1.0 A_{260} trockene tRNA wurden mit 3 μ l Ribonuklease P_1 (1 mg/ml) und 10 μ l 30 mM NH_4Ac , pH 5.3 versetzt und drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf eine 20 x 20 cm Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen, zweidimensional in Fließmittel A und B aufgetrennt und die Nukleotide durch UV-Bestrahlung identifiziert. Bei vorher mit ^{14}C -SAM radioaktiv markierter tRNA wurden die nachmethylierten Nukleotide durch anschließende Fluorographie identifiziert (siehe 3.1.4).

Fließmittel: A: i-Buttersäure : NH_3 konz. : H_2O
66 : 1 : 33

B: 0.1M $NaPO_4$ pH 6.8 : $(NH_4)_2SO_4$: n-Propanol
100 ml : 60 g : 2 ml

3.7.2 HPLC-Nukleosidanalyse nach enzymatischer P_1 -Nuklease-Hydrolyse

Mit dieser Methode wurde die Nukleosidzusammensetzung und damit das Modifikationsmuster von tRNAs bestimmt. 0.5 A_{260} trockene tRNA wurde durch Verdauung mit Nuklease P_1 in die Nukleoside aufgespalten und diese mittels HPLC (high-pressure-liquid-chromatography) an RP 18 Säulen aufgetrennt (Davis et al., 1979). Präparativ mit ^{14}C -SAM nachmethylierte tRNA mußte vor der P_1 -Verdauung aufbereitet werden. Um überschüssiges ^{14}C -SAM und Phenol abzutrennen, wurde die tRNA über Sephadex DE 52 gereinigt und über Sephadex G 25 entsalzt. Die P_1 -Verdauung wurde durchgeführt, wie in der Dissertationsarbeit von Mach (1981) beschrieben.

Für die Produktanalyse von ^{14}C -SAM methylierter tRNA wurde das HPLC-Eluat fraktioniert, diese Fraktionen mit Triton-X-Toluol Scintillationsflüssigkeit versetzt und so die Radioaktivität bestimmt. Da jedes Nukleosid bei einer bestimmten Retentionszeit von der Säule abgelöst wird, konnte das Produkt der Methylierung durch Zuordnung der Radioaktivität zu einer bestimmten Retentionszeit bestimmt werden.

3.7.3 Ein-Dimensionale Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der präparierten Initiations-tRNA^{fMet} wurde mit geringen Abwandlungen eine 1-dimensionale Gelelektrophorese nach der Methode von Fradin et al. (1975) durchgeführt. Das Trennprinzip beruht auf Unterschieden in der Ladung und dem Molekulargewicht der zu trennenden tRNAs. Alle Puffer wurden entgast verwendet. Die Polymerisation des Gels wurde mit der Zugabe von Ammoniumpersulfat (10%) und TMED gestartet. Die Elektrophorese lief 35 Stunden bei 400 V. Anschließend wurde das Gel Coomassie bzw. Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

Trenngel:

Acrylamid	12 g
Bisacrylamid	0.48 g
TEB-Puffer (10x)	12 ml
Harnstoff 7 M	68.6 ml
aqua bidest. ad	120 ml

Sammelgel:

Acrylamid	1.9 g
Bisacrylamid	0.1 g
Sammelpuffer	5 ml
Harnstoff 7 M	20 ml
aqua bidest.	8 ml

TEB-Puffer:

Tris	96.9 ml
EDTA	3.7 g
Borsäure pH 8.3	48.6 g
aqua bidest. ad	1000 ml

Sammelpuffer:

Tris/HCl pH 6.7	0.72 ml
aqua bidest. ad	100 ml

3.7.4 Isolierung der tRNA aus dem Gel

Die Lage der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden wurde durch UV-Bestrahlung detektiert, die einzelnen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und bei -70°C tiefgefroren. Die Gelstreifen wurden in gefrorenem Zustand zerstoßen, mit Aufschlußpuffer versetzt (NaAc 0.1 M pH 4.5, MgCl_2 10 mM, NaCl 0.3 M) und anschließend phenolisiert (Phenol: H_2O = 8:2). Die wässrige Phase wurde nach 3-stündigem Schütteln bei 20°C abgetrennt und die Phenolphase erneut mit Aufschlußpuffer gewaschen. Die vereinigten tRNA-haltigen wässrigen Phasen wurden mit Carrier-rRNA versetzt und mit kaltem Äthanol ausgefällt. Nach Abzentrifugieren, Trocknen und nochmaligem Umfällen mit Äthanol konnte die tRNA auf Aminoacylierungs- bzw. Formylierungsaktivität geprüft werden.

3.8 Hybridisierung von tRNA gegen genomische DNA von E.coli

Zur Bestimmung von tRNA-Genen wurde spezifische tRNA mit radioaktivem Jod-125 markiert (Tereba, 1973) und gegen genomische DNA-Stücke von E.coli hybridisiert. Dazu wurde genomische Gesamt-DNA von E.coli mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Restriktionsenzyme spalten DNA an spezifischen Schnittstellen, wodurch man DNA-Bruchstücke erhält. Diese DNA-Bruchstücke werden an Filterpapier gebunden und die spezifische tRNA dagegen hybridisiert (Kleimann et al., 1983). Die tRNA kann nur gegen DNA-Stücke hybridisieren, die zu ihr homologe Sequenzen besitzt, d.h. gegen DNA-Stücke, die tRNA-Gene tragen.

Verwendete Restriktionsenzyme

Eco RI
Hin dIII
Bam HI

Erkennungssequenz

GAAITC
AAGCTT
GGATCC

5' ——— 3'

3.9 Isolierung von Zellbestandteilen

3.9.1 Isolierung von Enzymen und Faktoren aus E.coli

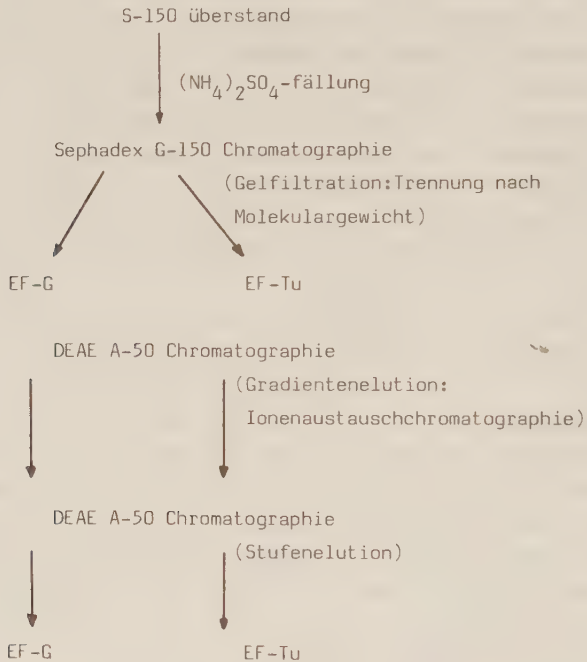
Für die "in vitro" Aminoacylierungen und die Methylierungen von tRNAs wurden Synthetasen- bzw. Methylasehaltige Fraktionen aus E.coli MRE 600 präpariert, die von endogener tRNA befreit worden waren. Die Präparation erfolgte wie bei Albani (1979) beschrieben, die Entfernung der endogenen tRNA wurde nach der Methode von Münch und Berg (1966) durchgeführt.

Der Proteingehalt der Enzymfraktionen wurde mit der BIO-RAD-Methode (Standardmethode der Firma Bradford, 1976) bestimmt. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 5-10 mg/ml. Verschiedene Präparationen, Proteingehalte und Aminoacylierungsaktivitäten zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1		Enzympräparationen (S-150)			
Bakterienstamm		E.coli MRE 600			
Züchtung Nr.		1	2	3	4
Feuchtgewicht (g)		20.1	18.7	24.2	24.0
Proteingehalt (mg/ml)		5.8	6.1	9.0	7.0
Aminoacylierungskapazität					
für Phe (pmol/A ₂₆₀)		45.1	64.6	46.6	42.5
Methylierungskapazität					
für tRNA aus E.coli IB 5		2 200	2 143	2 070	2 173
(pmol/A ₂₆₀)					

Elongationsfaktoren für die "in vitro" Proteinbiosynthese wurden nach der Methode von Wurbach und Nierhaus (1979) aus dem S-150 Überstand präpariert (Abb. 1). Initiationsfaktoren für die Bindungsversuche wurden mit wenigen Änderungen nach der Methode von Henshaw (1979) hergestellt. Die einzelnen Isolierungsschritte zeigt Abb. 2.

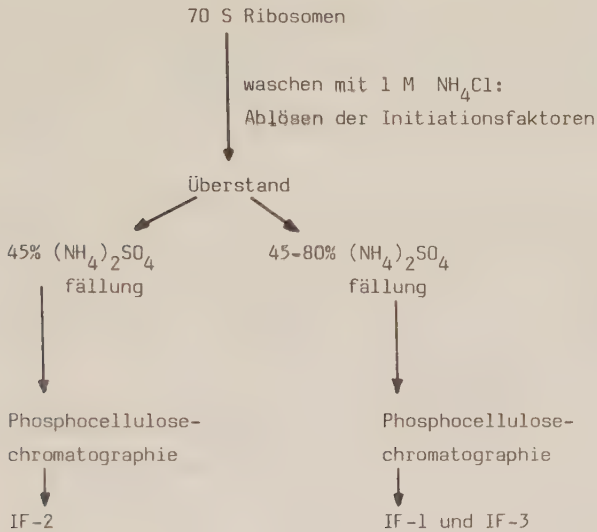
Abb. 1: Präparation der Elongationsfaktoren



Dialyse (50% Glycerinpuffer), aufbewahren bei -70 °C.

Glycerinpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.8
2 mM 2-Mercaptoäthanol
50 % Glycerin

Abb. 2: Präparation der Initiationsfaktoren



Dialyse und aufbewahren bei -70°C .

3.9.2 Isolierung von Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten

70 S Ribosomen (tight couples) wurden aus dem Rückstand der Enzympräparation wie von Albani beschrieben (1979) isoliert. Folgende Präparationen wurden in den Versuchen eingesetzt (Tab. 2).

Tabelle 2 Ribosomenpräparationen

Bakterienstamm	E.coli MRE 600			
Züchtung Nr.	1	2	3	4
Feuchtgewicht (g)	20.1	18.7	24.2	23.9
Ausbeute an 70 S				
(A ₂₆₀ /ml)	330	800	400	450

Für die Bindungsversuche mußten 70 S Ribosomen in ihre ribosomalen Untereinheiten (30 S und 50 S) aufgespalten werden. Zur Dissoziation der 70 S Ribosomen wurde die Magnesiumkonzentration erniedrigt, da die "tight couples" durch Magnesium zusammen gehalten werden. Die durch Dialyse gegen K-Ph-Diss-Puffer erhaltenen Untereinheiten wurden durch Zonalzentrifugation getrennt (Henshaw, 1979).

Dazu wurden die Ribosomen auf einen Gradienten von 6% bis 40% Saccharose in K-Ph-Diss-Puffer aufgetragen. Nach 17 Stunden Zentrifugation bei 62 000 g wurde der Gradient mit 50 %iger Zuckerlösung aus dem Rotor gepumpt und fraktioniert (Abb. 3).

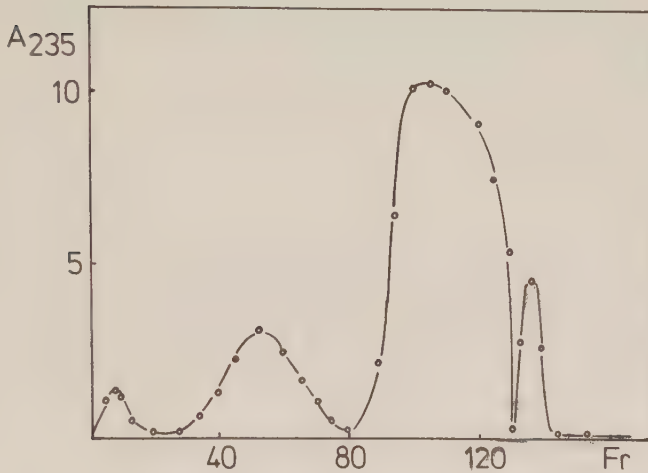
Die ribosomalen Untereinheiten wurden entsprechend ihrer Sedimentationskoeffizienten gesammelt. Nach Dialyse gegen TMNSH-Puffer wurden sie bei -70 °C aufbewahrt.

Die Aktivität der Untereinheiten wurde im konventionellen Poly(U)-Poly(Phe)-System überprüft. Durch die hohe Magnesiumkonzentration (15 mM) des Poly(U)Systems reassoziieren die ribosomalen Untereinheiten. Deshalb konnten sie unter diesen Bedingungen mit 70S Ribosomen verglichen werden.

K-Ph-Diss:	KH ₂ PO ₄ pH 7.5	10 mM
	MgCl ₂	1 mM
	β-Me	6 mM

TMNSH:	Tris/HCl pH 7.8	10 mM
	Mg(Ac) ₂	10 mM
	NH ₄ Cl	100 mM
	β-Me	6 mM

Abb. 3. Zonalzentrifugation von dissoziierten 70 S Ribosomen-
optisches Profil der Gradientenzentrifugation



2600 A_{260} 70 S Ribosomen wurden durch Dialyse in die ribosomalen Untereinheiten gespalten und diese mittels eines 6-40%igen Saccharosegradienten im Zonalrotor getrennt (je 335 ml 6 bzw. 40% Saccharose in K-Ph-Diss-Puffer). Die getrennten Untereinheiten wurden in 8 ml Fraktionen gesammelt und nach dem optischen Profil gepoolt. Die vereinigten Eluate ergaben nach Zentrifugation bei 100 000 g folgende Ausbeuten:

30 S Untereinheiten :	Fraktionen	45 - 65	400 A_{260}
50 S Untereinheiten :	Fraktionen	85 - 126	900 A_{260}
70 S Ribosomen :	Fraktionen	132 - 138	150 A_{260}

3.10 Poly(U) abhängige Proteinbiosynthese

Zellfreie Homo-peptidsynthese wurde mit isolierten Ribosomen, Transfer-RNA, Proteinfaktoren und Enzymfraktionen aus Bakterien durchgeführt. Mit synthetischem Messenger Polyuridylsäure wurde radioaktiv markiertes Polyphenylalanin gebildet.

3.10.1 Konventionelles System

Das "konventionelle System" von Traub & Nomura (1968), modifiziert nach Nierhaus und Dohme (1979) enthält folgende Bestandteile: Tris/Ac pH 8.0 (44 mM), Magnesium (15 mM), KAc (56 mM), DTT (1.6 mM); Phosphoenolpyruvat (6 mM) und 1.0 ug Pyruvatkinase als energie-regenerierendes System; GTP (0.5 mM) und ATP (2 mM) als energiebereit-stellende Substanzen ; 2.0 A₂₆₀ Ribosomen, 8 ug Poly(U), 60 ug Protein (S-100 von E.coli), ¹⁴C-Aminosäure und 3 A₂₆₀ tRNA.

Die Kinetik der Bildung von radioaktiv markiertem Polyphenylalanin wurde gemessen, indem zu bestimmten Zeiten ein Aliquot aus dem Reaktionsansatz entnommen und mit 5 ml 5 %iger TCA versetzt wurde. Die mitgefällte, bereits ¹⁴C-aminoacylierte tRNA wurde von gebildetem ¹⁴C-Polyphenylalanin durch 15-minütige Hydrolyse bei 90 °C abgetrennt. Nach Absaugen über Glasfaserfilter GF/A wurden die Filterplättchen neunmal mit 5 ml 5 % TCA, zweimal mit 5 ml Äthanol und einmal mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität wurde in einem Scintillationsflüssigkeitszähler ermittelt.

3.10.2 Poly(U) abhängige Poly(Phe)-Synthese im polyamin-abhängigen System

Die Ionenzusammensetzung im konventionellen Proteinbiosynthese-System entspricht nicht dem Milieu der Zelle. Jelenc & Kurland entwickelten ein Proteinbiosynthese-System, das den Verhältnissen der Zelle besser angepaßt ist (1979). Es arbeitet bei niedriger Magnesiumkonzentration (6mM), enthält an Stelle des artfremden Trispuffers Phosphatpuffer (5 mM), Calciumionen (0.5 mM) und die Polyamine Spermidin (1.5 mM) und Putrescin (8 mM).

Das bei diesen Versuchen verwendete optimierte System wurde etwas modifiziert, wie bei Kersten et al. (1981) beschrieben.

Alle folgenden Untersuchungen mit den zu vergleichenden tRNAs wurden im polyaminabhängigen, optimierten System durchgeführt.

3.11 Bindungsversuche mit Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten

3.11.1 Bindungsversuche von Initiations-tRNA am AUG programmierten 70 S Ribosom

AUG ist das Codon für die Aminosäure Methionin, das Initiationscodon für die Proteinbiosynthese. Vorbeladene ^3H -fMet-tRNA^{fMet} bindet an AUG programmierte 70 S Ribosomen, die durch Waschen mit 1 M NH_4Cl von Initiationsfaktoren befreit worden waren (siehe Abb. 2). Die Bindungsstudien wurden in Anwesenheit von Spermidin nach der Methode von Igarashi et al. (1980) mit geringen Änderungen bei 25°C durchgeführt. Gestartet wurde mit der Zugabe der vorbeladenen, radioaktiv markierten tRNA, gestoppt wurde die Reaktion durch Verdünnen mit kaltem Waschpuffer (Tris/HCl 50 mM pH 7.5, NH_4Cl 50 mM, MgAc_2 5 mM).

Der Komplex aus fMet-tRNA^{fMet} x AUG x 70 S Ribosom wurde an Nitro-cellulosefilter gebunden und diese durch Waschen von nicht komplex-gebundener ³H-fMet-tRNA^{fMet} befreit. Dieser Waschvorgang (Nirenberg und Leder, 1964) mußte sehr schnell erfolgen, da der Komplex sehr instabil ist. Nach einstündigem Trocknen bei 85 °C wurde die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt.

Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

1 M Tris/HCl pH 7.5	5 ul	50 mM
1 M NH ₄ Cl	5 ul	50 mM
100 mM DTT	1 ul	1 mM
50 mM GTP	2 ul	1 mM
100 mM MgAc ₂	5 ul	50 mM
50 mM Spermidin	4 ul	2 mM
IF 1	2.2 ug	
IF 2	2.6 ug	
IF 3	2.1 ug	
AUG	6.0 ug	
70 S Ribosomen	1 A ₂₆₀	
(frei von Initiationsfaktoren)		
fMet-tRNA ^{fMet} (³ H)	25 pmol	
aqua bidest. ad	100 ul	

3.11.2 Bindungsversuche von Initiations-tRNA an AUG programmierte 30 S ribosomale Untereinheiten

AUG kann mit der 30 S ribosomalen Untereinheit und der Initiations-tRNA^{fMet} einen Komplex bilden (30S-Initiationskomplex). Die Bindungsversuche an 30 S ribosomale Untereinheiten wurden analog zu den Bindungsversuchen am 70 S Ribosom durchgeführt. Statt 70 S Ribosomen wurden 4 A₂₆₀ 30 S Untereinheiten eingesetzt.

Die hohe Konservierung des T_ΨC-loops und die mögliche Wechselwirkung dieser Schleife mit ribosomaler RNA (zusammenfassende Literatur Ofengand 1982; Kersten 1984) legen nahe, daß Veränderungen an dieser Schleife Auswirkungen auf die Funktion der tRNA am Ribosom haben.

In Mutanten von E.coli (TrmA⁻) fehlt die tRNA-Uracil-5-Methyltransferase (Björk et al., 1970). Aus solchen Mutanten können tRNAs mit U an Stelle von T isoliert werden.

Untersucht werden sollte nun mit Hilfe der T-defizienten tRNAs:

i) der Einfluß von Ribosylthymin auf die Poly(U) abhängige Synthese von Polyphenylalanin im polyaminabhängigen, optimierten System.

ii) der Einfluß von Ribosylthymin auf die Fehlerrate, die durch den Einbau von Leucin in Polyphenylalanin verursacht wird. Für diese Untersuchungen zur Genauigkeit der Proteinsynthese sollte ermittelt werden, welcher der fünf tRNA^{Leu}-Isoakzeptoren von E.coli Fehler verursacht, und

iii) der Einfluß von Ribosylthymin in der tRNA^{fMet} bei der Initiation der Proteinsynthese, speziell im Hinblick auf die bei Prokaryonten notwendige Formylierung der Initiations-tRNA.

4.1 Einfluß von T auf Elongation und Genauigkeit

4.1.1 Trennung und Anreicherung der tRNA-Leucin-Isoakzeptoren

Aus mehreren Bakterienzüchtungen im 20 l Fermenter wurde Gesamt-tRNA der E.coli Stämme CP 79 (T-54 $relA^+$) und IB 5 (U-54 $relA^-$) präpariert (s. 3.4). Die tRNAs wurden anschließend auf Aminoacylierbarkeit (3.6.1) getestet, die tRNAs aus dem m^5U -Methylase defizienten Stamm E.coli IB 5 zusätzlich auf Methylierung an Position 54 der tRNA (3.6.3). Die Anzahl der Züchtungen und deren Ausbeuten zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3 Bakterienzüchtung und Analysendaten

Bakterienstamm	E.coli CP 79			E.coli IB 5		
Züchtung Nr.	1	2	3	4	5	6
Feuchtgewicht (g)	30	36	34	26	42	27
A ₂₆₀ tRNA	2 300	2 200	2 364	1 680	2 005	1 243
Aminoacylierung für						
Phe (pmol/A ₂₆₀)	32	53	26	38	40	42
Methylierung	-	-	-	2 300	2 160	2 430
(pmol/A ₂₆₀)						

Aus der Gesamt-tRNA wurden die Isoakzeptoren der Leucin-spezifischen tRNA nach der Methode von Pearson et al. (1971) an einer RPC-5 Säule getrennt. Bei der RP-Chromatographie ("reversed phase") ist die apolare Phase stationär gebunden und die polare Phase mobil. Dieses Material zeichnet sich durch gute Trennschärfe für tRNA-Isoakzeptoren sowie durch große Kapazität für tRNA aus. Eluiert wurde mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0.3 M NaCl bis 0.8 M NaCl bei pH 4.5.

Leucin-tRNA besitzt fünf Isoakzeptoren, die nach ihrer Elutionsfolge im RPC-5-Profil durchnummeriert werden (Holmes et al., 1977).

10 A₂₆₀ vorbeladene tRNA von E.coli CP 79 (¹⁴C-Leu) und E.coli IB 5 (³H-Leu) wurden co-chromatographiert, um ihre Isoakzeptorenmuster direkt miteinander vergleichen zu können (Abb. 4a). Die Isoakzeptorenmuster für tRNA^{Leu} von E.coli MRE 600 wurden mit denen von E.coli CP 79 verglichen. Bei Identität des Isoakzeptormusters konnten dann für die präparativen Ansätze die käufliche tRNA aus E.coli MRE 600 verwendet werden.

Für die präparative Herstellung der Leucin-tRNA-Isoakzeptoren wurden je 2 000 A₂₆₀ Gesamt-tRNA von E.coli MRE 600 und IB 5 über RPC-Säulen aufgetrennt. Die tRNA-Fractionen mit Leucinakzeptoraktivität im Suchtest wurden vereinigt und die tRNAs mit Äthanol ausgefällt. Bei der Präparation der einzelnen Leucin-tRNA-Isoakzeptoren kam es vorwiegend darauf an, sie von einander zu trennen. Sie in reiner Form zu isolieren wäre im Rahmen dieser Arbeit zu aufwendig gewesen.

Aus dem gleichen Säulenlauf wurde die Phenylalanin-tRNA abgetrennt, die entsprechenden Fractionen vereinigt und ebenfalls mit Äthanol ausgefällt (Abb. 4b). Die spezifische Aminosäureakzeptoraktivität der getrennten tRNA-Fractionen zeigt Tabelle 4.

Aus Gesamt-tRNA von E.coli CP 79, IB 5 und MRE 600 wurden nach den in der Literatur beschriebenen Methoden (Seno et al., 1968) die Initiations-tRNAs isoliert. Die geringen Änderungen bei der Präparation der spezifischen tRNA^{fMet} sind in der Dissertation von E. Männlein beschrieben (1983).

Abb.4a: Chromatographische Auftrennung von E.coli Gesamt-tRNA an RPC-5 - Trennung der Leucin-Isoakzeptoren

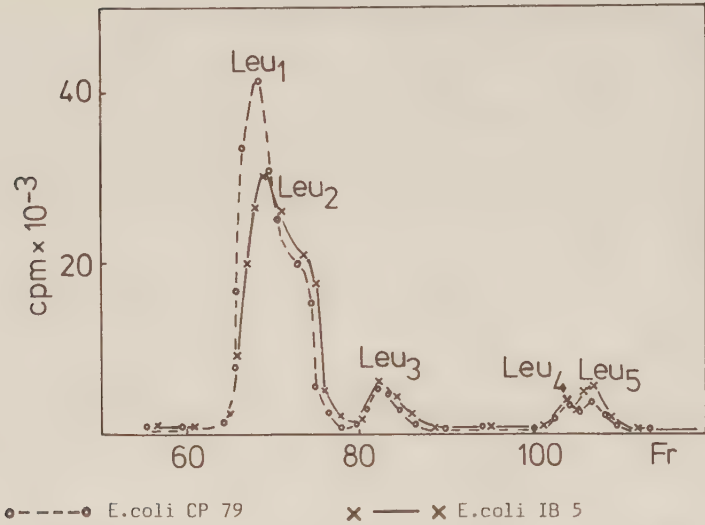
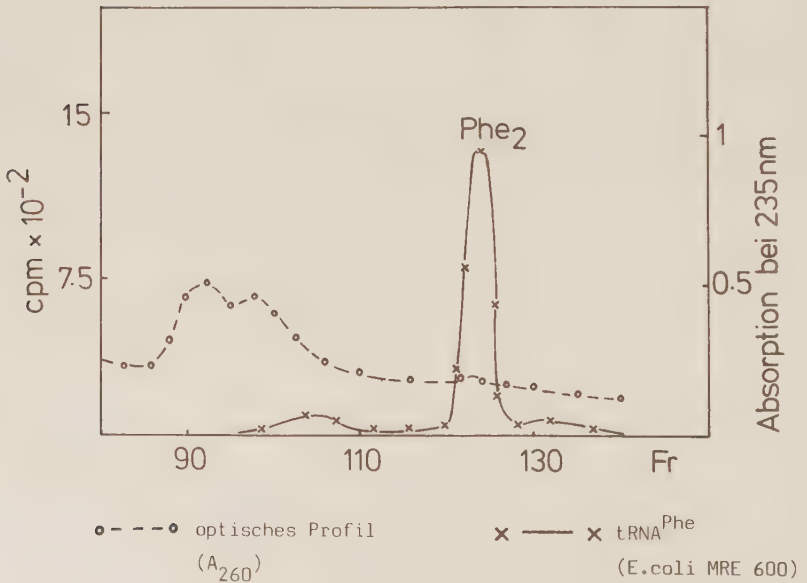


Abb.4b: Chromatographische Auftrennung der E.coli Gesamt-tRNA an RPC-5 - Abtrennung des Phenylalanin-Isoakzeptors



Legende zu Abb. 4a:

10 A₂₆₀ Gesamt-tRNA von E.coli CP 79 (¹⁴C-Leu) und IB 5 (³H-Leu) wurden mit Leucin beladen und an einer RPC-5 Säule (62 x 1.2 cm) co-chromatographiert.

Isoakzeptorenmuster von E.coli CP 79 ● — — — ●

Isoakzeptorenmuster von E.coli IB 5 × ——— ×

Elutionsgradient: je 180 ml Puffer A und B

Durchfluß: 21 ml/Std. Fraktionsvolumen: 3 ml

Legende zu Abb. 4b:

Optisches Profil der Auftrennung einer Gesamt-tRNA aus E.coli an einer RPC-5 Säule (135 x 1.7 cm). Abtrennung des Phenylalanin-Isoakzeptors, identifiziert durch Aminoacylierungssuchtest.

Elutionsgradient: je 1 500 ml Puffer A und B

Durchfluß: 21 ml/Std. Fraktionsvolumen: 6.5 ml

Puffer A: 0.3 M NaCl, 0.01 M NaAc, 0.01 M MgAc₂, 0.001 M β-Me,

Puffer B: siehe Puffer A, aber 0.8 M NaCl, pH 4.5

Tabelle 4: Ausbeute und Aminosäureakzeptoraktivität der an RPC-5 getrennten Leucin- und Phenylalaninspezifischen tRNAs

Bakterienstamm	E.coli MRE 600					
Isoakzeptor-tRNA	Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5	Phe 2
Fraktion Nr.	66-71	72-75	81-85	101-105	106-110	123-126
Aminosäureakzeptor-aktivität(pmol/A ₂₆₀)	73	75	64	73	210	604
Gesamt A ₂₆₀	100	95	55	45	15	25
Bakterienstamm	E.coli IB 5					
Isoakzeptor-tRNA	Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5	Phe 2
Fraktion Nr.	66-72	73-75	81-85	101-105	106-110	123-127
Aminosäureakzeptor-aktivität(pmol/A ₂₆₀)	127	195	60	81	156	740
Gesamt A ₂₆₀	120	50	100	35	20	17

4.1.2 Elongation der Proteinbiosynthese

Bei früheren Vergleichen von I-haltigen und I-defizienten tRNAs konnten im üblichen Poly(U)-Poly(Phe)-System keine Unterschiede im Elongationszyklus der Proteinbiosynthese festgestellt werden (Björk et al., 1971). Das konventionelle System war möglicherweise zu unempfindlich, feine Unterschiede zu zeigen, die auf der Änderung nur einer Modifikation in der tRNA beruhten. Daß die Methylierung an Position 54 der tRNA für E.coli von Vorteil ist, konnte von Björk et al. (1971) gezeigt werden. Wird der I-haltige Elternstamm mit der Mutante gemischt, so ließ sich nach 22 Verdoppelungen die U-haltige Mutante nicht mehr nachweisen.

Von Jelenc und Kurland wurde 1979 ein modifiziertes Poly(U)-Poly(Phe)-System entwickelt, bei dem Mg^{2+} partiell durch Polyamine und Ca^{2+} ersetzt wurde (Bedingungen siehe 3.10.2).

Die I-haltigen und I-defizienten tRNAs sollten daher in polyamin-haltigen, zellfreien Homopeptidsynthesystemen geprüft werden. Zunächst wurden Untersuchungen über die Spezifität verschiedener Polyamine durchgeführt.

4.1.3 Einfluß von Polyaminen

Polyamine kommen in unterschiedlicher Konzentration in den verschiedensten Zellen vor. Aufgrund ihrer kationischen Struktur binden sie an DNA, RNA und Ribosomen. Sie stimulieren die Proteinbiosynthese und steigern die Genauigkeit der Translation (Jelenc und Kurland, 1979). Spermidin steigert die Elongationsrate und die Menge an vollständig translatierten Produkten bei Translation von Kaninchen mRNA im Weizenkeimsystem (Abraham, 1980), es schützt die Messenger RNA vor frühzeitiger Degradation (Hunter, 1977) und moduliert die Translation verschiedener Klassen von mRNA in HeLa-Zellen (Atkins, 1975). An der "Assembly" von ribosomalen Proteinen und rRNA sind ebenfalls Polyamine beteiligt (Algranati, 1977).

Ob die Stimulation der Proteinsynthese allein durch die positive Ladung der Polyamine oder durch eine bestimmte Kettenlänge bedingt wird, sollte in Versuchen mit Analoga der Polyamine im Poly(U) translatierenden System überprüft werden.

Die Spermidinanaloge waren Triamine der Struktur $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, (n von 3 bis 8; n=4 : Spermidin). Die Putrescinanaloge waren Diamine der Struktur $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ (n von 3 bis 8; n=4 : Putrescin).

Im Poly(U) abhängigen Poly(Phe)-System wurde Spermidin (1.5 mM) mit den verschiedenen Putrescinanaloge bzw. Putrescin (8mM) mit den verschiedenen Spermidinanaloge kombiniert eingesetzt. Die Konzentrationen der Analoga entsprachen dabei der Konzentration des ersetzten Polyamins. Die Synthese von Polyphenylalanin unter diesen Bedingungen zeigen die Abb. 5 a, b. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz, in dem Spermidin und Putrescin zusammen eingesetzt wurden (Normalansatz).

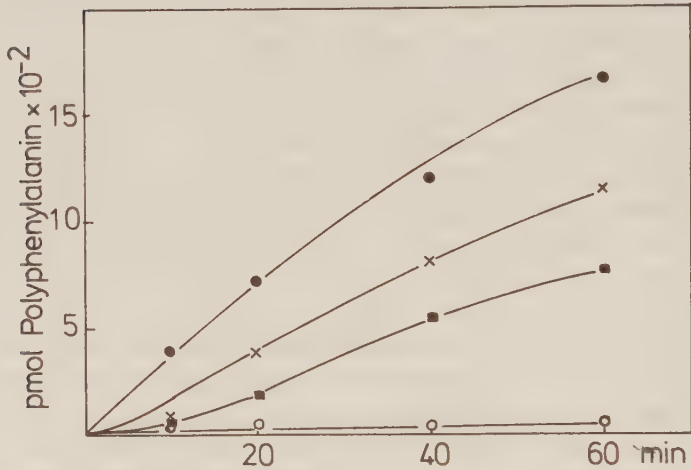
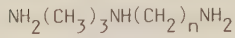
Die Poly(U) abhängige Synthese von Polyphenylalanin ist streng abhängig von Spermidin. War nur Putrescin, aber kein Spermidin in der Reaktionsmischung, so wurde kein Polypeptid gebildet.

Norspermidin ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$), ein um eine CH_2 -Gruppe verkürztes Analogon des Spermidins, erhöhte die Synthese um 40 % gegenüber der Kontrolle; alle anderen eingesetzten Analoga des Spermidins erniedrigten die Polyphenylalaninsynthese (Abb. 5a).

Putrescin hat im verwendeten System nur stimulierenden Einfluß. So fand im Gegensatz zum Ansatz ohne Spermidin noch Proteinsynthese statt, wenn kein Putrescin im Ansatz war. Diaminoheptan ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_7\text{NH}_2$), ein Putrescinanalogon, steigerte die Synthese ebenfalls um 40 % gegenüber der Kontrolle. Die anderen geprüften Analoga hatten entweder keinen Einfluß oder erniedrigten die Bildung von Polyphenylalanin.

Norspermidin und Diaminoheptan stimulierten beide die Syntheserate und die Menge an gebildetem Endprodukt. Die Gesamtmolekülkettenlänge ist für beide Substanzen dieselbe (die mittlere NH -Gruppe des Norspermidins ist durch eine CH_2 -Gruppe im Diaminoheptan ersetzt). Dies wäre ein Hinweis darauf, daß die Molekülkettenlänge entscheidend am Einfluß der Polyamine bei der Proteinbiosynthese beteiligt ist.

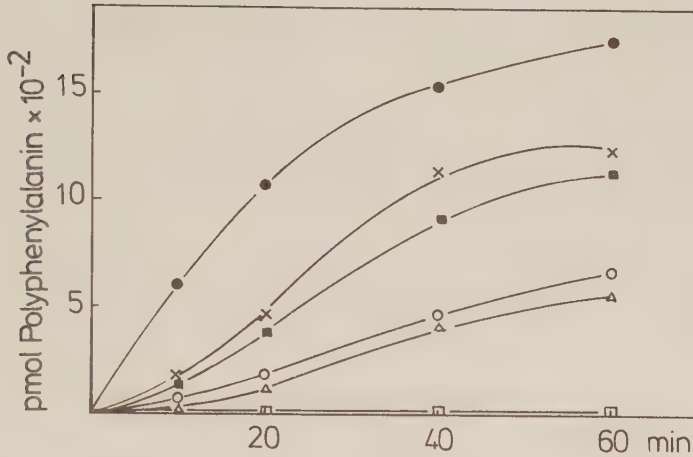
Abb. 5a: Spermidinanaloga im Poly(U)Poly(Phe)System



Ersatz von Spermidin durch Spermidinanaloga (1.5 mM). Die Putrescinkonzentration war konstant und betrug 8 mM. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Spermidin und Putrescin mitgeführt. Die Reaktionsdurchführung ist bei Kersten et al., 1981 beschrieben.

- x — x n = 4 Spermidin = Kontrollansatz
- — ● n = 3 Norspermidin
- — ■ n = 5, 6, 7, 8
- — ○ Ansatz ohne Spermidin

Abb. 5b Putrescinanaloga im Poly(U)Poly(Phe)System
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$



Ersatz von Putrescin durch Putrescinanaloga (8mM). Die Spermidinkonzentration ist in allen Ansätzen konstant und beträgt 1.5 mM. Die Versuchsdurchführung und die weiteren Versuchsbedingungen entsprechen dem Ansatz mit den Spermidinanaloga.

- × — × n = 4 Putrescin = Kontrollansatz
- — ● n = 7 Diaminoheptan
- — ■ n = 4, 5
- △ — △ n = 2, 8
- — □ n = 3 Diaminopropan
- — ○ Ansatz ohne Putrescin

Diaminopropan ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$) hemmt die Poly(Phe)-Synthese total. Ein ähnlicher Effekt wurde von Kay und Benzie (1980) im Kaninchenreticulozytenlysat beschrieben. Diaminopropan ist ein Teil des Spermidinmoleküls. Deshalb wäre es möglich, daß Diaminopropan am Ribosom die Stelle blockiert, an die der Diaminopropananteil des Spermidinmoleküls assoziiert. In diesem Fall sollte der Hemmeffekt des Diaminopropan durch Erhöhung der Spermidinkonzentration ganz oder teilweise kompensiert werden können. Dies war tatsächlich möglich, siehe Tabelle 5.

Die Aminoacylierung wurde durch Diaminopropan nicht beeinflusst. Getestet wurde die Aminoacylierung mit einer E.coli MRE 600 Gesamt-tRNA mit Phenylalanin und einer spezifischen tRNA^{Lys} mit Lysin.

Tabelle 5 Hemmung der Poly(U)abhängigen Synthese von Poly(Phe) mit Diaminopropan - Einfluß der Spermidinkonzentration

		gebildetes Poly(Phe) (cpm)			
Diaminopropan (mM)		1	1	1	~
Spermidin (mM)		1	3	5	
(min)	10	300	30 920	30 625	
	20	640	41 340	69 800	
	40	1 390	70 100	98 995	
	60	2 385	94 305	112 935	
Diaminopropan (mM)		3	3	3	
Spermidin (mM)		1	3	5	
(min)	10	235	845	12 310	
	20	280	1 940	30 870	
	40	275	3 840	58 105	
	60	335	5 795	80 595	

4.1.4 Untersuchungen zur Codon-Anticodon-Wechselwirkung

Bei der Proteinsynthese in der Zelle können verschiedene Fehler bei der Übersetzung des genetischen Codes vorkommen. Eine dieser Fehlermöglichkeiten besteht darin, daß eine "falsche" Aminosäure in die wachsende Proteinkette eingebaut wird. Dazu muß ein Codon mit einem "falschen" Anticodon basenpaaren.

Da nicht jede beliebige Basenpaarung möglich ist, muß das "falsche" Anticodon dem richtigen sehr ähnlich sein.

Einer dieser möglichen Übersetzungsfehler ist der Einbau der Aminosäure Leucin (Codon UUG, UUA) an Stelle der Aminosäure Phenylalanin (Codon UUU, UUC).

In vivo treten solche Translationsfehler mit einer Häufigkeit von 1 in 10 000 auf. Der Überlebensvorteil des T-haltigen E.coli Stammes gegenüber dem nicht T-haltigen Stamm könnte durch eine größere Genauigkeit des T-haltigen Stammes bei der Proteinsynthese bedingt sein.

Im früheren konventionellen Poly(U)Poly(Phe)System konnte diese niedrige Fehlerrate nicht gemessen werden, sie lag hier im Bereich von 1 in 100 (Dissertation Männlein, 1983).

Yamaizumi et al. (1980) synthetisierte an Poly(U) Polyleucin. Dies war allerdings nur bei sehr hohen Magnesiumkonzentrationen (20 mM) möglich. Das Experiment zeigt aber, daß das Codon UUU von tRNA^{Leu} gelesen werden kann. Gavrilova et al. (1981) untersuchten die Polyleucinsynthese an Poly(U) codierten Ribosomen in Abhängigkeit von den Elongationsfaktoren EF-Tu, EF-G und von GTP. Die Elongationsfaktoren beeinflussen die Fehlsynthese von Polyleucin bei Magnesiumkonzentrationen größer als 10 mM im Ansatz.

Das modifizierte , polyaminabhängige System ermöglichte es, genauer zu messen und so die Auswirkung nur einer Modifikationsänderung, weit entfernt vom Anticodon, auf die Genauigkeit der Proteinsynthese zu untersuchen.

In diesem modifizierten Poly(U)Poly(Phe)System wurde als Konkurrenz zu Phenylalanin die Aminosäure Leucin angeboten, da die Codons für Phenylalanin-tRNA (UUU, UUC) und Leucin-tRNA (UUA, UUG) sich nur in der dritten Base unterscheiden. Diese Konkurrenzreaktion um das Codon UUU wurde mit T- bzw. U-haltiger Gesamt-tRNA durchgeführt. Die molaren Verhältnisse der eingesetzten tRNAs waren dabei 1:1. Gemessen wurde die Synthese von ^{14}C -markiertem Polyphenylalanin in Gegenwart von "kaltem" Leucin, und in einem zweiten Ansatz der Einbau von ^3H -Leucin in Polyphenylalanin in Gegenwart von "kaltem" Phenylalanin. Der "Fehleinbau" von Leucin in Polyphenylalanin wurde durch den Quotienten $\frac{\text{Leu}}{\text{Phe} + \text{Leu}}$ ausgedrückt. Beim Vergleich von U-haltiger Gesamt-tRNA mit T-haltiger Gesamt-tRNA ergab sich für die U-haltige ein um 6-12fach größerer Leucineinbau (Tab. 6).

Tabelle 6 Fehleinbau von Leucin in Polyphenylalanin

Inkub.zeit (min)	Einbau mit T-haltiger Gesamt-tRNA			
	Phe (pmol)	Leu (pmol)	$\frac{\text{Leu}}{\text{Phe} + \text{Leu}} \times 10^{-4}$	
40	521	0.3	5.7	
60	902	0.3	3.3	
90	1 356	0.3	2.9	
	Einbau mit U-haltiger Gesamt-tRNA			
40	520	1.9	36.4	
60	846	2.7	31.8	
90	1 336	5.0	37.3	

Im polyaminabhängigen System wurden 2.2 nmol ^{14}C -Phe und 2.2 nmol kaltes Leucin bzw. 2.2 nmol kaltes Phenylalanin und 2.2 nmol ^3H -Leucin in Parallelansätzen eingesetzt.

Für Leucin gibt es fünf Isoakzeptor-tRNAs mit unterschiedlichen Anticodon (Tab. 7). Grosjean et al. (1979) zeigte mit Hilfe von tRNA-tRNA-Komplexen, wobei die tRNAs zueinander komplementäre Anticodon besitzen, daß der tRNA^{Leu}₅-Isoakzeptor mit der tRNA^{Lys} (Anticodon UUU) basenpaart.

Tabelle 7 Codons und Anticodons der Leucin-Isoakzeptoren

tRNA-Isoakzeptor	Anticodon	Codon
Leu 1	CAC	CUG
Leu 2	GAG	CUG + CUA
Leu 3	GAG	CUU + CUC
Leu 4	XAA	UUG
Leu 5	XAA	UUG + UUA

X = modifiziertes U (Grosjean, 1979)

Es stellte sich die Frage, ob der erhöhte Leucineinbau in Polyphenylalanin durch die U-haltige Gesamt-tRNA von einem bestimmten Leucin-Isoakzeptor verursacht wurde, oder ob alle Isoakzeptoren in gleicher Weise daran beteiligt waren. Dazu wurden die durch RPC-5 Chromatographie getrennten Isoakzeptoren der I- bzw. U-haltigen Leucin-tRNAs zusammen mit dem isolierten Phenylalanin-Isoakzeptor im "Misreading-Ansatz" eingesetzt entsprechend dem Ansatz mit Gesamt-tRNA. Bei beiden tRNA-Species zeigte nur der 4. Leucin-Isoakzeptor einen meßbaren Leucineinbau in die Polyphenylalaninkette, die anderen Leucin-Isoakzeptoren zeigten keinen meßbaren Einbau von Leucin (Tab. 9).

Bei den bisher beschriebenen Experimenten wurden beide tRNAs, die Phe-tRNA und die Leu4-tRNA, entweder U- oder I-haltig eingesetzt. Die Fehleinbaurate betrug für den Ansatz mit tRNA I-54 8×10^{-4} , für den mit tRNA U-54 28×10^{-4} . Wenn die Möglichkeit einer falschen Codon-Anticodon-Wechselwirkung am Ribosom durch die Schnelligkeit der Bindung der tRNA in die A-Seite des Ribosoms bedingt wird und die U-haltige tRNA langsamer in die A-Seite gebunden wird, dann sollten die Einbauraten für Leucin bei gemischter Verwendung der I/U-haltigen Phe- und Leu4-tRNAs zwischen den Einbauraten für homologe tRNAs liegen.

Dazu wurden folgende Experimente durchgeführt:

Da nur tRNA^{Leu}₄ signifikant am Fehleinbau beteiligt ist, wurde Phe-tRNA(I) mit Leu4-tRNA(U) bzw. Phe-tRNA(U) mit Leu4-tRNA(I) im Poly(U)System eingesetzt. Daß die Leucineinbauraten wie postuliert zwischen den Einbauraten bei homologer Verwendung der tRNAs liegen, zeigt Tabelle 8.

Bei dieser gemischten Verwendung der Phe- tRNAs (mit und ohne I) und Leu4-tRNAs (mit und ohne I) waren die Unterschiede in der Fehlerrate geringer .

Tabelle 8 Fehleinbau von Leucin in Polyphenylalanin mit tRNA Leu4

tRNA	Inkub.zeit (min)	Einbau von Phe(pmol)	Leu(pmol)	$\frac{\text{Leu}}{\text{Phe} + \text{Leu}} \times 10^{-4}$
Leu4 T54	40	884	0.6	6.3
Phe T54	60	1 133	0.7	5.9
	90	1 609	1.4	8.8
Leu4 U54	40	1 325	2.0	15.1
Phe U54	60	1 585	3.7	23.0
	90	1 793	5.1	28.4
Leu4 T54	40	1 182	0.9	7.4
Phe U54	60	1 603	0.8	5.0
	90	1 863	4.1	22.0
Leu4 U54	40	1 207	1.4	11.7
Phe T54	60	1 532	1.7	11.2
	90	1 682	3.7	22.0

Die Isoakzeptoren wurden entsprechend ihrer Aminosäureakzeptoraktivität eingesetzt. Die Versuchsbedingungen waren wie unter Poly(U) im Kurland-system beschrieben.

4.1.5 Geschwindigkeit der Elongation

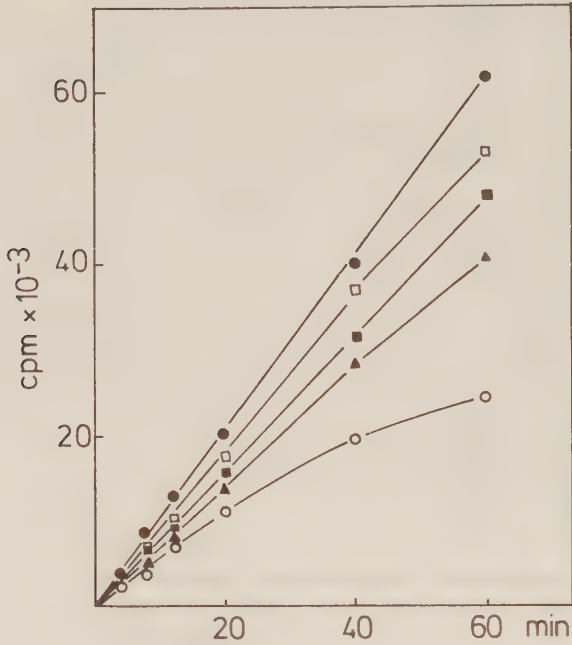
Ob die im zellfreien Modellsystem der Proteinsynthese beobachtete Verringerung der Fehlerraten den "in vivo" beobachteten Überlebensvorteil des T-haltigen Elternstammes verursacht, ist bisher unklar. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte im Poly(U)-Poly(Phe)System mit U54- bzw. T54-haltiger tRNA die Elongationsrate untersucht werden.

Für tRNA^{Lys} wurde von Kersten et al. (1981) gezeigt, daß die Bindung der U54-haltigen tRNA^{Lys} in die A-Seite des Ribosoms deutlich geringer ist als die von tRNA^{Lys} T54. Da es keinen direkten Test für die A-Seitenbindung der Phe-tRNA^{Phe} im Komplex mit Ef-Tu und GTP gibt, wurde die Kinetik der Bildung von Poly(Phe) mit tRNA (U54) und tRNA (T54) bis 3 Minuten bei zunehmender tRNA-Konzentration untersucht und damit die Anfangsgeschwindigkeit der Elongation bestimmt. tRNA in Konzentrationen über fünf A₂₆₀ pro Ansatz hemmten die Proteinsynthese. Abb. 6 zeigt, daß die Elongationsrate mit der tRNA (T54) höher ist, als mit tRNA (U54) (Praisler et al., 1981).

Setzte man beide tRNAs (U-haltige und T-haltige) gemeinsam in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander ein, so wurde mit steigendem Anteil an T-haltiger tRNA schneller und mehr Polyphenylalanin gebildet (Abb. 7).

Diese Versuche spiegeln die Verhältnisse für eukaryontische tRNAs wieder. Bei Eukaryonten existieren tRNA-Klassen, die partiell Ribosylthymine an Position 54 der tRNA besitzen. Roe et al. (1976) fanden ebenfalls, daß mit steigendem Anteil an Ribosylthymine in der tRNA, die Elongationsrate ansteigt.

Abb. 7 Abhängigkeit der Polyphenylalaninbildung vom
Anteil T-haltiger tRNA im Ansatz



Im optimierten polyaminabhängigen System wurden Gesamt-tRNA (T-54) aus und Gesamt-tRNA (U-54) in verschiedenen Verhältnissen zueinander in einem Ansatz eingesetzt. Die Gesamtkonzentration der tRNA betrug

$1.5 A_{260}$

- | | | | |
|-------|----------------------|-------|----------------------|
| ○ — ○ | 100 % U-haltige tRNA | □ — □ | 75 % T-haltige tRNA |
| ▲ — ▲ | 25 % T-haltige tRNA | ● — ● | 100 % T-haltige tRNA |
| ■ — ■ | 50 % T-haltige tRNA | | |

Damit ist für drei verschiedene Elongations-tRNAs - tRNA^{Lys} , tRNA^{Leu} und tRNA^{Phe} - in drei verschiedenen zellfreien Systemen der Einfluß des Ribosylthymins bei der Wechselwirkung der tRNA mit der A-Seite des programmierten Ribosoms gezeigt.

Hinzu kommen die Untersuchungen von Roe mit eukaryontischen tRNAs T54 und U54, bei denen zellfreie Systeme der Proteinsynthese mit natürlicher Messenger RNA eingesetzt wurden.

Für eukaryontische tRNAs konnte gezeigt werden, daß Ribosylthymine die Geschwindigkeit der Bildung des Komplexes $\text{EF-Tu} \times \text{GTP} \times \text{AA-tRNA}$ mit der A-Seite beschleunigt.

Die hier dargelegten Befunde sprechen ebenfalls für eine Erhöhung von V_{max} bei der Bildung des Komplexes $\text{EF-Tu} \times \text{GTP} \times \text{Elongations-tRNA}$ mit der A-Seite. Da sich die tRNA-Konzentration bei der Homopeptidsynthese nicht beliebig erhöhen läßt, konnte V_{max} nicht ermittelt werden. Es könnte nach unseren Befunden auch die Affinität bei der Bindung in die A-Seite für $\text{tRNA (T54)} \times \text{EF-Tu} \times \text{GTP}$ gegenüber tRNA (U54) erhöht sein.

Im folgenden Teil der Arbeit sollte bei einem weiteren Teilschritt der Proteinbiosynthese - der Initiation - Auswirkungen der Modifikation Ribosylthymine auf die Bindung der Initiations-tRNA an das Ribosom untersucht werden.

Prokaryonten besitzen polycistronische Messenger RNA. Die Initiation des ersten Cistrons startet an der 30S ribosomalen Untereinheit, abhängig von AUG und IF-2, wobei der Initiationsfaktor 2 unter anderem die aminoacylierte fMet-tRNA^{fMet} vor spontaner Hydrolyse schützt, ähnlich wie der Elongationsfaktor Tu die Elongations-tRNAs (Pongs et al., 1974, Petersen et al., 1979). Durch Dazutreten der 50 S ribosomalen Untereinheit kann der erste Elongationszyklus begonnen werden. Nach Beendigung der Translation des ersten Cistrons werden die folgenden Cistrons des Messengers mit 70 S Ribosomen gestartet.

Prokaryonten initiieren mit formylierter Methionin-tRNA an polycistronischen Messengern, während in Eukaryonten unformylierte Initiations-tRNAs an monocistronischen Messengern die Proteinsynthese starten. Eubakterielle tRNA hat Ribosylthymine im T_ΨC-loop, während bei Eukaryonten verschiedene Initiations-tRNAs vorkommen, - mitochondriale und cytosolische. Mitochondriale eukaryontische Initiations-tRNAs unterscheiden sich in ihrer Sequenz dabei weniger von den Initiations-tRNAs der Eubakterien, stärker von den cytosolischen Initiations-tRNAs der Eukaryonten. Diese haben im T_ΨC-loop AUC oder AU* C, wobei U* ein unmodifiziertes Uridin bedeutet. Die Initiations-tRNAs der Mitochondrien können ebenfalls wie prokaryontische Initiations-tRNAs formyliert werden (Gray et al., 1983).

Es wird seit langem postuliert, daß die Formylierung der Initiations-tRNA der Prokaryonten nötig ist, um interne AUG-Codons von Startcodons der späteren Cistrons zu unterscheiden (Petersen et al., 1976).

Bei folat-abhängigem *Streptococcus faecalis* und bei *B.subtilis* wurde beobachtet, daß das Fehlen der Formylgruppe an der Initiations-tRNA durch Uridin in Position 54 der tRNA kompensiert werden kann (Rabinowitz et al., 1974; Arnold et al., 1977). Bei *Streptococcus faecalis* wurde die Bildung des 70S-Initiationskomplexes an Poly(A,G,U) programmierten 70S Ribosomen mit unformylierter tRNA^{fMet} aus in folatfreiem und folathaltigem Medium gewachsenen *Streptococcus* verglichen. Dabei bindet die unformylierte Met-tRNA^{fMet} aus folatfreien Zellen besser an die Initiationscodons als die unformylierte Met-tRNA^{fMet} aus folathaltigem. Dünnschichtchromatographische Analyse der Nukleotide der Initiations-tRNA ergab für die tRNA^{fMet} aus folatfreien Zellen, daß Ribosylthymine an Position 54 durch Uridin ersetzt war. Diese Ribosomenbindungsversuche wurden in Tris-Puffer und bei Magnesiumkonzentrationen größer als 10 mM durchgeführt.

Bei *Bacillus subtilis*, der in Trimethoprim-haltigem Medium gewachsen war, startet die Proteinsynthese ebenfalls unformyliert, da Trimethoprim die Tetrahydrofolatreduktase hemmt (Arnold et al., 1977). Die Initiations-tRNA hat bei *B.subtilis* dabei ebenfalls Uridin an Position 54.

Die Funktion von Ribosylthymine sollte deshalb in Abhängigkeit von der Formylierung der Initiations-tRNA im polyaminabhängigen optimierten System für die Bindung an die 30S ribosomale Untereinheit und für das 70S Ribosom überprüft werden.

4.2.1 Bindung der Initiations-tRNA an die AUG programmierte 30 S Untereinheit

Untersuchungen über die Funktion der Formylierung der Initiations-tRNA bei der Bindung an die 30S ribosomale Untereinheit wurden bisher unter Bedingungen durchgeführt, die stark von "in vivo" Verhältnissen abweichen. Es wurde nur I-haltige Initiations-tRNA formyliert und unformyliert in ihren Bindungsaktivitäten verglichen. An dissoziierten Ribosomen wurden keine Unterschiede mit formylierter und unformylierter I-haltiger tRNA^{fMet} gefunden (Petersen et al., 1976).

Unter Polyaminbedingungen wurde an der 30S ribosomalen Untereinheit bisher nur für I-haltige, formylierte tRNA^{fMet} die Rolle der Initiationsfaktoren untersucht. Es wurde gefunden, daß Spermidin die Bindung an die 30S Untereinheit stimuliert, unabhängig von der Anwesenheit der Initiationsfaktoren (Igarashi et al., 1980).

Mit Initiations-tRNAs aus TrmA⁺ und TrmA⁻-Mutanten sollte deshalb die Bindung an die 30S Untereinheit im polyaminabhängigen, optimierten System abhängig von der Formylierung der tRNA^{fMet} und der Anwesenheit von Initiationsfaktoren untersucht werden.

Die Versuchsbedingungen waren den Verhältnissen der Zelle angeglichen, d.h. es wurde bei niedriger Magnesiumkonzentration (5 mM) und in Anwesenheit von Spermidin (2 mM) gearbeitet. Die Bindungsversuche wurden als Kinetiken durchgeführt, wobei die tRNA^{fMet} aus dem TrmA⁺ Stamm mit der tRNA^{fMet} aus dem TrmA⁻ Stamm formyliert und unformyliert, mit und ohne Initiationsfaktoren verglichen wurde (Abb. 8 a-d).

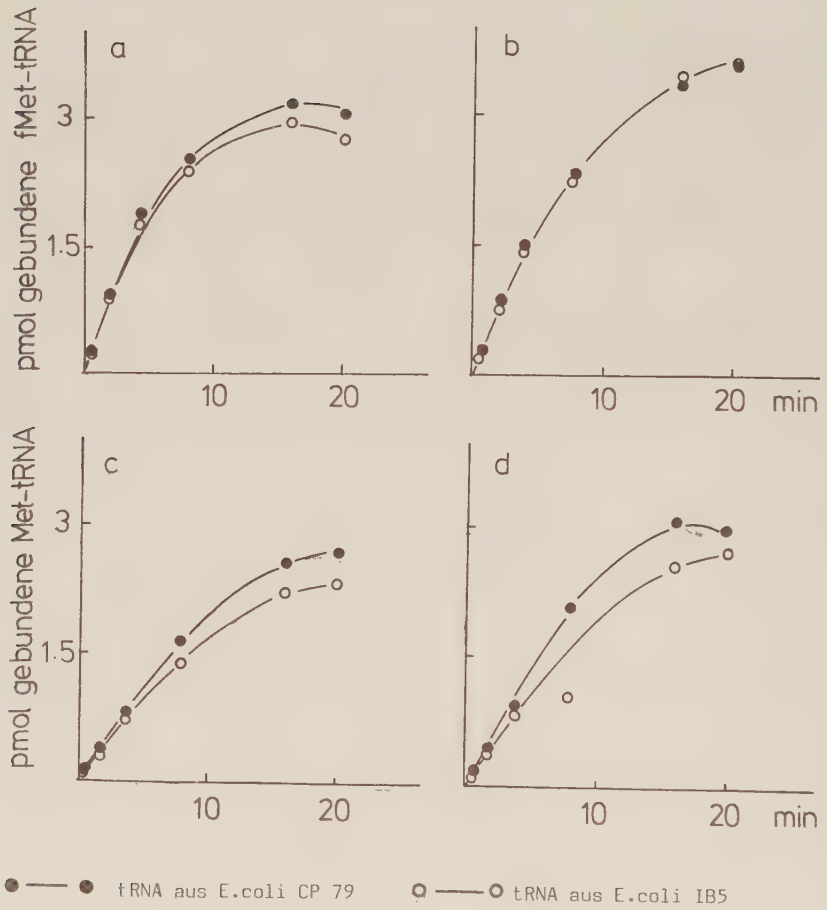
Formylierte $fMet$ -tRNAs^{fMet} von E.coli (I-54 und U-54) bildeten unabhängig von der Anwesenheit der Initiationsfaktoren gleich viele AUG x $fMet$ -tRNA^{fMet} x 30 S Komplexe bei gleicher Bildungsgeschwindigkeit (Abb. 8 a,b).

Bei unformylierter Met-tRNA^{fMet} bildete die U-haltige tRNA etwas weniger Initiationskomplexe (Abb. 8 c,d).

Vergleicht man die Anfangsgeschwindigkeiten bei der Komplexbildung, so ist diese sowohl für die U-haltige als auch für die I-haltige tRNA größer, wenn diese formyliert eingesetzt wurden.

Bei der Bildung des 30 S-Initiationskomplexes hat Ribosylthimin in der tRNA^{fMet} auch im polyaminabhängigen System also keine sichtbare Auswirkung. Unabhängig von Ribosylthimin war die höhere Bildungsgeschwindigkeit der formylierten $fMet$ -tRNA^{fMet} gegenüber der unformylierten Met-tRNA^{fMet}.

Abb. 8 Bindung von Initiations-tRNA an die AUG programmierte 30 S Untereinheit



Legende zu Abb 8:

Der Ansatz enthielt 25 pmol vorbeladene, formylierte fMet-tRNA^{fMet} (a,b) bzw. nicht formylierte Met-tRNA^{fMet} (c,d) von E.coli CP 79 und IB 5 (³H Met= 20 000 cpm/Ansatz), 6 ug AUG, 4 A₂₆₀ 30 S ribosomale Untereinheiten und ca. 2 ug an Initiationsfaktoren. Die Magnesiumkonzentration betrug 5 mM im Ansatz, die Spermidinkonzentration 2 mM.

- — ● tRNA^{fMet} aus E.coli CP 79 (I-54)
○ — ○ tRNA^{fMet} aus E.coli IB 5 (U-54)

- a) fMet-tRNA^{fMet} + Initiationsfaktoren
b) fMet-tRNA^{fMet} - Initiationsfaktoren
c) Met-tRNA^{fMet} + Initiationsfaktoren
d) Met-tRNA^{fMet} - Initiationsfaktoren

4.2.2 Bindung der Initiations-tRNA an das 70S Ribosom

Da die Anwesenheit von Ribosylthymine in der tRNA keine Auswirkung auf die Bildung des 30 S-Initiationskomplexes zeigte, wurden die T- bzw. U-haltigen Initiations-tRNAs weiterhin auf ihre Bindungsaktivitäten bei der Ausbildung des 70S-Initiationskomplexes verglichen. Vorbeladene tRNA^{fMet} wurde formyliert (fMet-tRNA^{fMet}) und unformyliert (Met-tRNA^{fMet}), mit und ohne Initiationsfaktoren eingesetzt (vergleiche Bindung an die 30S-Untereinheit).

Formylierte fMet-tRNA^{fMet} (U) zeigte ohne Initiationsfaktoren geringere Bindungsaktivität als die T-haltige fMet-tRNA^{fMet}. In Anwesenheit von Initiationsfaktoren zeigten beide tRNAs formyliert keine Unterschiede (Abb. 9 a,b).

Bei unformylierter Initiations-tRNA konnten jedoch in keinem Fall (+/- Initiationsfaktoren) wesentliche Unterschiede in den Bindungsaktivitäten gefunden werden (Abb. 9 c,d).

Die Bildungsgeschwindigkeit des 70 S-Initiationskomplexes ist für unformylierte Met-tRNA^{fMet} größer als für formylierte fMet-tRNA^{fMet}, unabhängig von Ribosylthymine in der tRNA (Abb. 9 a,c). Es wurden jedoch insgesamt weniger Komplexe mit unformylierter tRNA gebildet.

Alle diese Befunde stehen im Gegensatz zu denen von Rabinowitz (1974), der T- bzw. U-haltige Initiations-tRNA aus *Streptococcus faecalis* am AUG programmierten 70S Ribosom vergleicht.

Für tRNA^{fMet} T54 und tRNA^{fMet} U54 aus dem Folsäure-auxotrophen *Streptococcus*-Stamm ist bei Anwesenheit der Initiationsfaktoren die Bindungsaktivität der unformylierten T-haltigen Met-tRNA^{fMet} deutlich geringer (30%) als diejenige der U-haltigen (70%), bezogen auf formylierte fMet-tRNA^{fMet}. Ohne Initiationsfaktoren sind die Aktivitäten beider unformylierter tRNAs deutlich erniedrigt.

Im Unterschied zu Rabinowitz et al. wurde bei unseren Versuchen das polyaminabhängige System verwendet. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Bindung der unformylierten T-bzw. U-haltigen tRNA^{fMet} an das AUG programmierte 70S Ribosom können mehrere Ursachen haben.

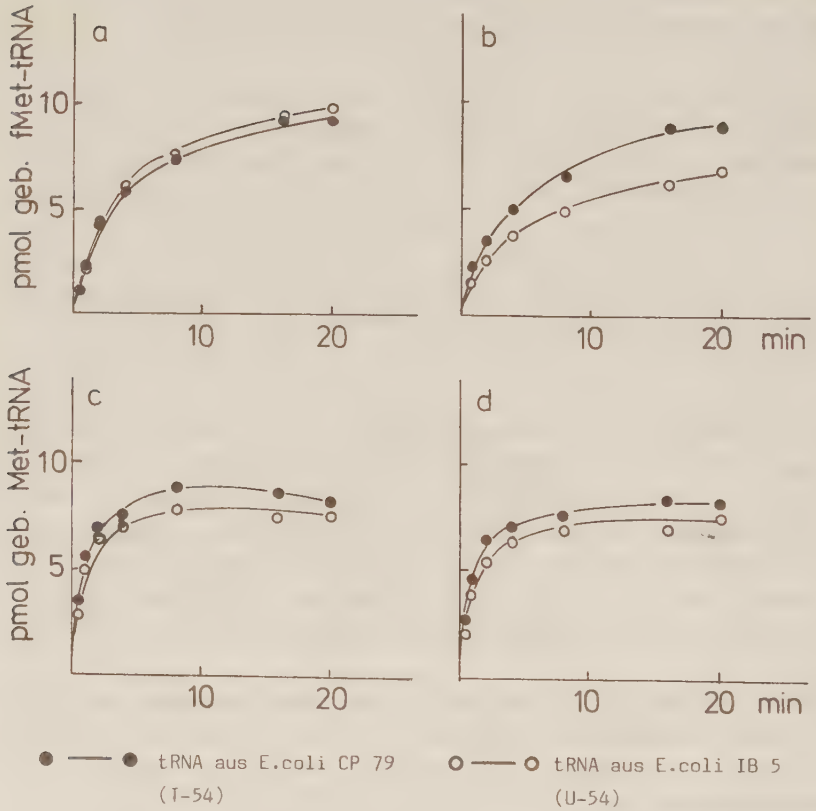
i) Bei den Versuchen von Rabinowitz waren keine Polyamine im Testansatz, dafür wurde bei höherer Magnesiumkonzentration (10 mM) gearbeitet. Welche Rolle - außer einem allgemein stimulierenden Effekt - die Polyamine bei der Initiation spielen, ist nicht näher bekannt. Durch die Erniedrigung der Magnesiumkonzentration (5 mM) im polyaminabhängigen System könnten zusätzliche Einflüsse am Ribosom auftreten, da Magnesium eine wesentliche Rolle bei der Assoziation der ribosomalen Untereinheiten spielt.

ii) Rabinowitz et al. führten ihre Untersuchungen mit *Streptococcus faecalis*, einem gram-positiven Organismus durch, wohingegen unsere Versuche mit *E.coli*, einem gram-negativen Bakterium durchgeführt wurden. Es ist bekannt, daß bei gram-positiven Prokaryonten die Formylierung der tRNA und die Methylierung des Uridins zu Ribosylthymine vom selben Coenzym, der Tetrahydrofolsäure, abhängen. Bei den gram-negativen Prokaryonten dagegen wird die Methylierung von einer S-Adenosylmethionin abhängigen Methyltransferase katalysiert.

iii) Deshalb könnten Unterschiede in den Initiations-tRNAs des von Rabinowitz verwendeten *Streptococcus faecalis* und der von uns verwendeten *E.coli* Stämme eine der Ursachen für die verschiedenen Versuchsergebnisse sein.

Die Initiations-tRNA aus dem von uns verwendeten TrmA⁻ und dem TrmA⁺ *E.coli* Stämmen wurde deshalb genauer analysiert.

Abb. 9 Bindung von Initiations-tRNA an das AUG programmierte 70 S Ribosom



- a. fMet-tRNA^{fMet} + Initiationsfaktoren
 b. fMet-tRNA^{fMet} - Initiationsfaktoren
 c. Met-tRNA^{fMet} + Initiationsfaktoren
 d. Met-tRNA^{fMet} - Initiationsfaktoren

Die genauen Versuchsbedingungen siehe Abb. 8

4.2.3 Charakterisierung der spezifischen Methionin-tRNA

Bei diesem Stand der Arbeit wurde gefunden, daß mit Gesamt-tRNA von E.coli CP 79 (IrmA⁺) auch unformyliert MS2 Phagen RNA translatiert werden kann (Dissertation Männlein, 1983). Nach den bisherigen Vorstellungen und Befunden sollte die aus diesem Stamm gewonnene tRNA mit T an Position 54 unformyliert nicht initiieren. Die Initiations-tRNA des T-haltigen Stammes E.coli CP 79 wurde deshalb auf ihren Gehalt an Ribosylthymine untersucht.

4.2.4 Methylierung der tRNA^{fMet}

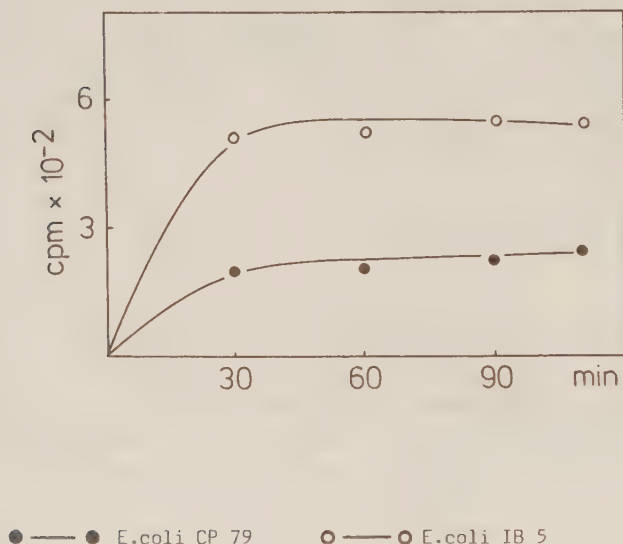
Die Aminosäureakzeptoraktivität der tRNA^{fMet} von E.coli MRE 600, CP 79 und IB 5 betrug 1 000 - 1 200 pmol/A₂₆₀ tRNA. Diese Initiations-tRNAs waren zu ca. 90 % an der Aminogruppe formylierbar.

Die modifizierten Basen der Initiations-tRNA sind durch Sequenzanalyse mit dem E.coli Stamm CA 265 bekannt (Dube et al., 1968). Die tRNA^{fMet} enthält folgende Modifikationen: s⁴U, D, T(m⁵U), Ψ, Cm und m⁷G.

Methyliert man die tRNA^{fMet} von E.coli CP 79 mit ¹⁴C-S-Adenosylmethionin und tRNA-freiem S-150 Extrakt aus E.coli MRE 600, so erhält man einen Einbau von 450-500 pmol CH₃/A₂₆₀ tRNA.

Die Gesamt-tRNA von E.coli CP 79, aus der diese Initiations-tRNA präpariert worden war, war mit ¹⁴C-SAM nicht nachmethylierbar. Die Initiations-tRNA eines Methylase-haltigen Stammes war somit im Gegensatz zur Gesamt-tRNA zu ca. 30 % untermodifiziert. Die Initiations-tRNA des U-haltigen Stammes E.coli IB 5 war mit 1 800 pmol CH₃/A₂₆₀ tRNA nachmethylierbar (Abb. 10).

Abb. 10 Methylierung der Initiations-tRNAs von E.coli CP 79 und IB 5



Je 0.1 A₂₆₀ tRNA^{fMet} aus E.coli CP 79 und IB 5 wurden mit ¹⁴C-SAM methyliert (spezifische Aktivität 10.9 mCi/mmol). Versuchsdurchführung siehe 3.6.3. Als Methylase wurde ein tRNA-freier S-150 Extrakt von E.coli MRE 600 verwendet. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug 250 ug.

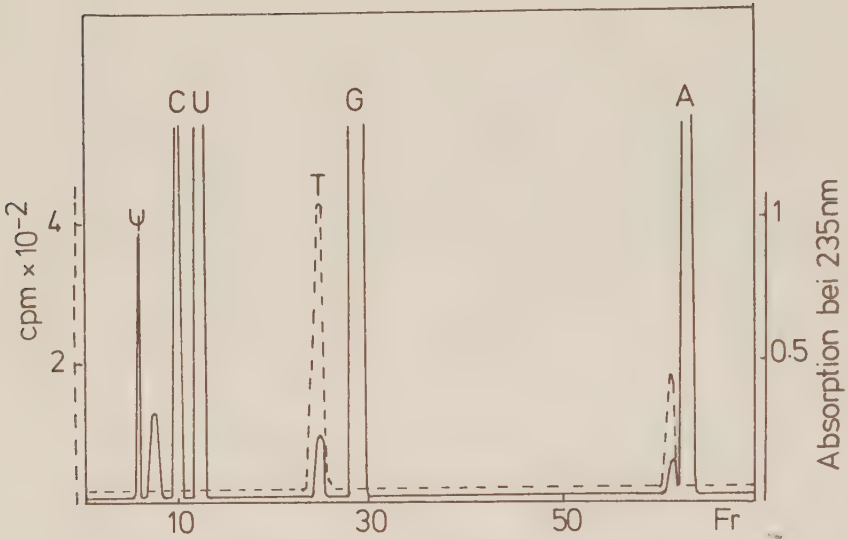
Von der tRNA^{fMet} ist weiterhin eine "minor species" bekannt, bei der an Stelle von m⁷G ein unmodifiziertes Adenin vorkommt (Dube et al., 1968). Durch Produktanalyse der nachmethylierten tRNA^{fMet} von E.coli CP 79 sollte festgestellt werden, welche Base der Initiations-tRNA untermodifiziert war.

4.2.5 HPLC-Analyse der Nukleoside von ^{14}C -Methyl-markierter $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ von E.coli CP 79

Um die nachmethylierte Base der Initiations-tRNA von E.coli CP 79 zu identifizieren, wurden 1.5 A_{260} $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ in Ansätzen von jeweils 0.1 A_{260} tRNA mit ^{14}C -SAM methyliert. Die tRNA wurde durch Phenolisieren aus dem Reaktionsansatz abgetrennt und über Sephadex DE 52 und G 25 gereinigt. Diese ^{14}C markierte $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ wurde mit Nuklease P_1 und alkalischer Phosphatase zu Nukleosiden abgebaut (siehe 3.7.2), die durch HPLC-Chromatographie aufgetrennt wurden. Die Hauptbasen und die modifizierten Nukleoside wurden entsprechend ihren Retentionszeiten identifiziert (Abb. 11, optisches Profil). Die ^{14}C -Methyl-Radioaktivität wurde mit Triton-X-Toluol-Scintillatorflüssigkeit in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

Die Retentionszeit des nachmethylierten, radioaktiv markierten Nukleosids entsprach derjenigen des Ribosylthymins (Abb. 11). Geringe Radioaktivität wurde in einer Fraktion gefunden, die kurz vor Adenin eluiert. Keine der bisher bekannten, in tRNAs vorkommenden Basenmodifikationen eluiert an dieser Stelle, so daß dieses Produkt nicht identifiziert werden konnte.

Abb. 11 Trennung von Nukleosiden durch HPLC



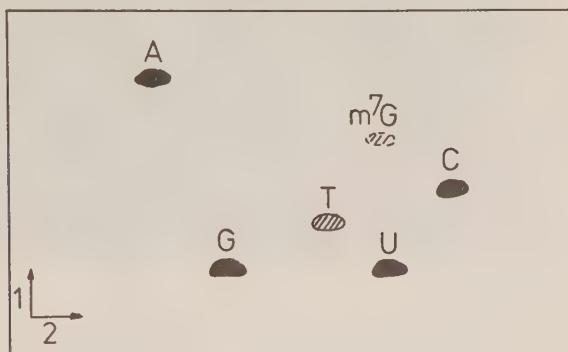
Trennung der Nukleoside nach präparativer Methylierung der tRNA^{fMet} von E.coli CP 79 mit ¹⁴C-SAM und anschließender Verdauung mit Nuklease P₁ und alkalischer Phosphatase. Die Bedingungen der HPLC-Analyse sind in 3.7.2 beschrieben. Das Eluat wurde in 500 µl Fraktionen gesammelt und die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen nach Zugabe von Triton-X-Toluol-Scintillator gemessen.

- optisches Profil
- - - Radioaktivitätsprofil der HPLC-Fractionen

4.2.6 P_1 -Verdauung und zwei-dimensionale Dünnschichtchromatographie der Nukleotide von tRNA^{fMet} von E.coli CP 79

Eine weitere Möglichkeit nachzuweisen, daß Uridin (54) methyliert wird zu Ribosylthymine, ist die Auftrennung der Nukleotide der tRNA durch zwei-dimensionale Dünnschichtchromatographie. Die präparativ methylierte tRNA^{fMet} von E.coli CP 79 wurde nach Reinigung über Sephadex DE 52 und G 25 (siehe 3.7.2) mit P_1 -Nuklease verdaut und die erhaltenen Nukleotide zwei-dimensional chromatographiert. Die Lage der Hauptbasen (A,C,G,U) wurde zur Zuordnung der radioaktiv markierten Nukleotide mittels UV-Detektion bestimmt und auf der Dünnschichtplatte markiert. Zur Identifizierung der ^{14}C -nachmethylierten Produkte wurde die Radioaktivität durch Fluorographie nachgewiesen. Die Hauptradioaktivität wurde ebenfalls an der Position des Ribosylthymins gefunden, geringe Aktivität war an der Position des m⁷G (Abb.12).

Abb. 12 Trennung von 5'Nukleotiden



2-dimensionale Dünnschichtchromatographie der P_1 -verdauten Initiations-tRNA von E.coli CP 79 nach Methylierung mit ^{14}C -SAM. Verdauungsbedingungen und Fließmittel sind wie in 3.7.1 beschrieben. Die Hauptbasen (A,C,G,U) wurden mittels UV-Detektion identifiziert, die nachmethylierten ^{14}C -markierten Produkte durch Fluorographie.

4.2.7

Ein-dimensionale Gelelektrophorese

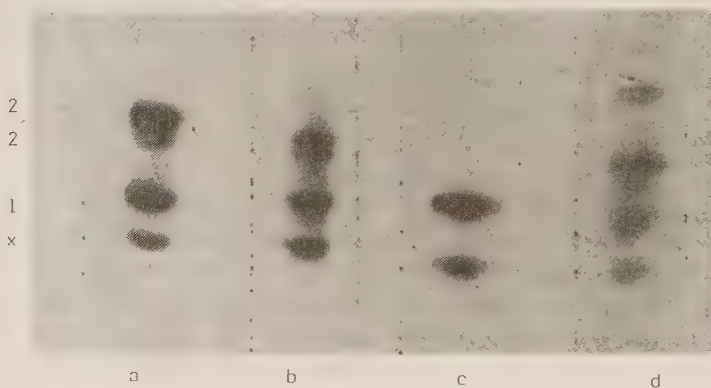
Die Initiations-tRNA von E.coli CP 79 konnte nachmethyliert werden mit ca. 500 pmol $\text{CH}_3/\text{A}_{260}$ tRNA. Dies könnte auf das Vorhandensein von zwei verschiedenen tRNAs^{fMet} in diesem E.coli Stamm hindeuten, oder auf eine, partiell untermodifizierte tRNA^{fMet}.

Durch ein-dimensionale Gelelektrophorese sollte überprüft werden, ob eine zweite tRNA^{fMet} bei E.coli CP 79 existiert.

Nach der Methode von Fradin (1975) wurden je 0.3 A_{260} tRNA^{fMet} von E.coli MRE 600, CP 79 und IB 5 auf einem 1.5 mm starken Polyacrylamid/Bisacrylamid-Gel aufgetrennt.

Die tRNA^{fMet} von E.coli IB 5 (a) und E.coli CP 79 (b) spaltete bei dieser Trennung in jeweils vier Banden auf, die tRNA^{fMet} von E.coli MRE 600 (c) in zwei Banden (Abb. 13).

Abb. 13 Gelelektrophorese der Initiations-tRNAs^{Met} von E.coli CP 79, IB 5 und MRE 600



0.3 A_{260} der tRNA^{fMet} von E.coli MRE 600, CP 79 und IB 5 wurden über ein 1.5 mm Acrylamid/Bisacrylamidgel aufgetrennt (35 Stunden bei 400 V). Zusammensetzung des Gels und der Puffer siehe 3.7.3. UV-Detektion der einzelnen Banden nach Anfärben mit Ethidiumbromid. Die beiden obersten Banden von E.coli CP 79 und IB 5 waren kaum aufgetrennt und wurden deshalb als 2 und 2' bezeichnet. Als Vergleich wurde Gesamt-tRNA von E.coli MRE 600 mitgeführt.

- a. tRNA^{fMet} E.coli IB 5 b. tRNA^{fMet} E.coli CP 79
c. tRNA^{fMet} E.coli MRE 600 d. Gesamt-tRNA (Vergleich)

Die für die Gelelektrophorese verwendeten tRNAs^{fMet} waren auf Grund ihrer Aminosäureakzeptoraktivität (ca. 1 100 pmol/A₂₆₀ tRNA) nur zu ca. 80 % reine Initiations-tRNAs. Um die Banden einer bestimmten spezifischen tRNA zuordnen zu können, wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und die tRNA aus jeder Bande isoliert (siehe 3.8). Jede der so isolierten tRNAs wurde auf Beladbarkeit mit Methionin und auf Formylierbarkeit getestet (Tab. 10). Als Leerwert wurde ein tRNA-freier Gelstreifen mitgeführt, der auf gleiche Art behandelt wurde.

Tabelle 10 Aminosäureakzeptoraktivität und Formylierungsaktivität der elektrophoretisch aufgetrennten Banden der tRNA^{fMet} von E.coli MRE 600, CP 79 und IB 5

tRNA ^{fMet} species	E.coli CP 79			E.coli IB 5			E.coli MRE 600
Bande NR.	1	2	2'	1	2	2'	1
Aminosäureakzeptor-aktivität (cpm)	153	505	273	701	771	238	1 155
Formylierungs-aktivität (cpm)	164	474	260	392	380	94	718

Da bei der Isolierung der tRNAs aus dem Gel 16S rRNA zum Mitfällen zugefügt wurde, konnten die cpm-Werte nicht in pmol/A₂₆₀ umgerechnet werden. Es konnte nur eine qualitative Aussage getroffen werden, ob die tRNA Methionin akzeptierte oder nicht.

Die unterste Bande (x) war bei keiner Initiations-tRNA mit Methionin beladbar. Dies deutet auf eine andere tRNA als Verunreinigung hin. Keine der aus dem Gel isolierten tRNAs war mit SAM und Enzymextrakt methylierbar, auch die U-haltige tRNA von E.coli IB 5 nicht. Die tRNA ist nach dem Eluieren aus dem Gel strukturell verändert, sie kann auch nur noch partiell aminoacyliert werden. Es konnte deshalb keine Zuordnung für T- oder U-haltige tRNA zu den einzelnen Banden getroffen werden.

Da die elektrophoretisch getrennten tRNAs^{fMet} nicht methyliert werden konnten, sollten durch HPLC-Analyse die Modifikationsmuster der tRNAs aus den verschiedenen Banden verglichen werden.

Die aus den Gelbanden isolierten tRNAs wurden mit Nuklease P₁ und alkalischer Phosphatase verdaut und die so erhaltenen Nukleoside über HPLC getrennt. Die Trennung erfolgte wie bei 3.7.2 beschrieben.

Durch die sehr geringen und unterschiedlichen tRNA-Konzentrationen der einzelnen Gelbanden, konnten in den HPLC-Profilen keine Unterschiede im Modifikationsmuster entdeckt werden.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden je 0.25 A₂₆₀ tRNA der einzelnen Banden an Dr. Kuchino, Japan, geschickt. Die Untersuchung ergab für die tRNA^{fMet} aus den Banden 2 und 2' von E.coli CP 79 und IB 5 das Fehlen einer weiteren Modifikation, s⁴U, an Position 8 der tRNA.

s⁴U an Position 8 der tRNA kann mit Cytidin an Position 13 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und so die Konformation der tRNA beeinflussen. Fehlt die Thiogruppe am Uridin, so könnte eine Konformationsänderung möglich sein, durch die die tRNA^{fMet} bei der Gelelektrophorese das veränderte Laufverhalten zeigt.

4.3 Untersuchungen über die Methylierung von U54 zu T54 in Elongations- und Initiations-tRNAs

4.3.1 Methylierungsaktivitäten von Enzymextrakten aus E.coli CP 79

Im folgenden sollte versucht werden zu klären, warum Elongations-tRNAs von E.coli CP 79 in Bezug auf T54 voll modifiziert sind, der Stamm jedoch partiell T-defiziente tRNA^{fMet} enthält. Als eine von vielen Arbeitshypothesen bot sich an, daß unter bestimmten Bedingungen in den Zellen ein Hemmstoff vorkommt, der die Methylierung der Initiations-tRNA, nicht aber die Methylierung der Elongations-tRNA an Position 54 beeinflußt.

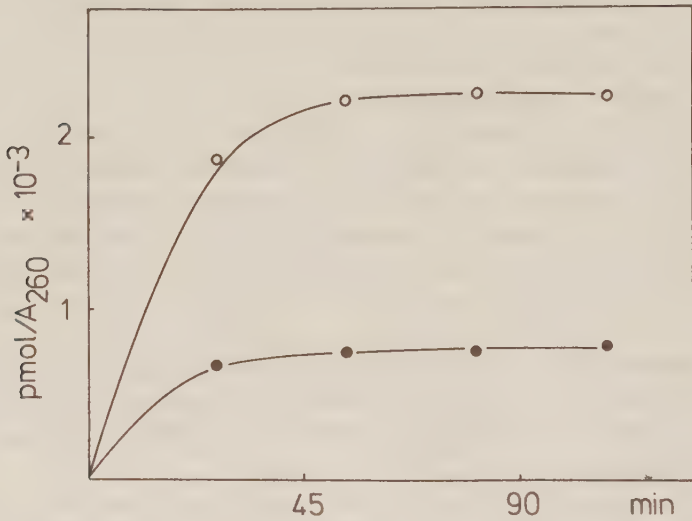
Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst ein S-100 Extrakt aus E.coli CP 79 präpariert, der die m⁵U-Methylase enthält. Mit diesem Extrakt wurden sowohl Initiations- als auch Elongations-tRNAs von E.coli IB 5 (U-54) methyliert.

Die T-defizienten Elongations-tRNAs von E.coli IB 5 wurden mit diesem Rohextrakt vollständig nachmethyliert, die Methylierung der Initiations-tRNAs war gehemmt (Abb. 14).

Zur Methylierung wurden zunächst 250 µg Protein eingesetzt. Um die Initiations-tRNA doch noch vollständig zu methylieren, wurde die Proteinkonzentration im Ansatz erhöht. Diese Erhöhung auf 500 µg bzw. 750 µg Protein im Ansatz ergab keine Steigerung der Methylierungsaktivität, es wurden dagegen noch weniger Methylgruppen eingebaut. Durch Erniedrigen der Proteinkonzentration auf 125 bzw. 62,5 µg Protein im Ansatz konnte mehr tRNA^{fMet} nachmethyliert werden.

Dieses Ergebnis könnte auf einen Hemmstoff im Extrakt hinweisen, der bei niedriger Proteinkonzentration entsprechend mitverdünnt wurde. Dieser Hemmstoff müßte spezifisch für die Initiations-tRNA sein, da die Methylierung der Elongations-tRNAs nicht von der Proteinkonzentration im Ansatz abhängig war.

Abb. 14 Methylierung T-defizienter Initiations- und Elongations-tRNAs mit S-100 aus E.coli CP 79



● — ● tRNA^{fMet} aus E.coli IB 5
○ — ○ tRNA^{Phe} aus E.coli IB 5

Die Methylierung wurde analog 3.6.3 durchgeführt. Als Methylase wurde ein Rohextrakt aus E.coli CP 79 verwendet; der Proteingehalt betrug 9 mg/ml; im Ansatz wurden 250 ug Protein und je 0.1 A₂₆₀ tRNA eingesetzt. Spezifische Aktivität von ¹⁴C-SAM = 10.9 mCi/mmol.

Niedermolekulare Substanzen können aus Proteingemischen durch Dialyse entfernt werden. Deshalb wurde der Rohextrakt (S-100) von E.coli CP 79 gegen TMNSH-Puffer dialysiert und anschließend wieder auf Methylaseaktivität getestet. Der so behandelte Extrakt zeigte keinerlei Unterschiede zum unbehandelten Extrakt (Abb. 15). Ein niedermolekularer Hemmstoff der Methylierung von U54 zu I54 für Initiations-tRNA konnte deshalb ausgeschlossen werden.

Der zur Methylierung eingesetzte Rohextrakt enthält außer der m^5U -Methylase alle löslichen Enzyme und Faktoren, sowie tRNAs. Fällt man mit Ammoniumsulfat die Proteine aus diesem Gemisch aus und setzt diesen Extrakt (entsalzt durch Dialyse gegen TMNSH-Puffer) im Methylierungsansatz ein, so wird die tRNA^{fMet} von E.coli IB 5 nun mit 1 500 pmol CH_3/A_{260} tRNA vollständig methyliert (Abb. 15).

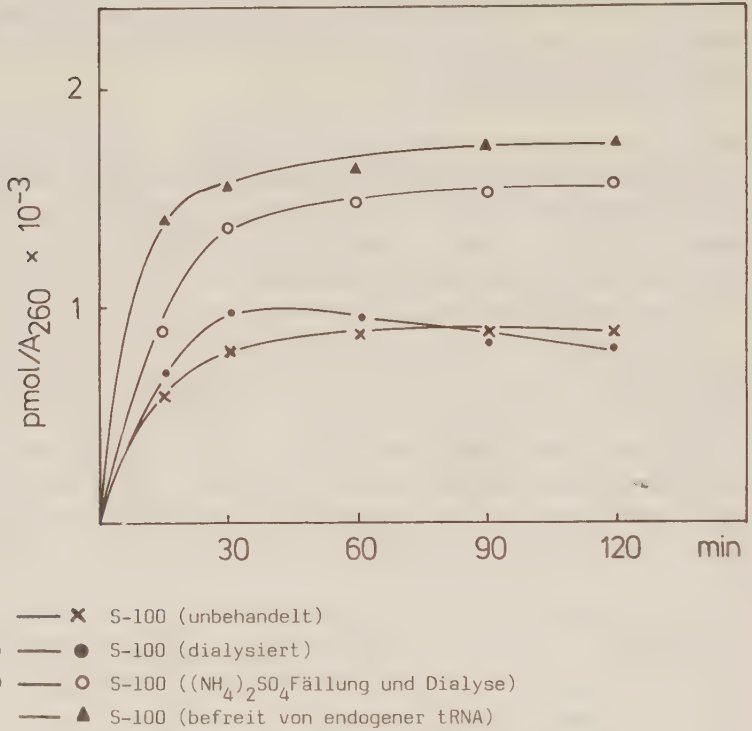
Der Rohextrakt von E.coli CP 79 enthält außer Proteinen auch noch die endogene tRNA.

Entfernt man diese durch Sephadex DE 52 Chromatographie (siehe 3.9.1) und verwendet diesen tRNA-freien S-100 zur Methylierung der tRNA^{fMet} von E.coli IB 5, so wird diese tRNA mit 1 800 pmol CH_3/A_{260} tRNA vollständig methyliert (Abb. 15).

Diese verschiedenen Methylierungsansätze zeigen, daß die Methylierung der tRNA^{fMet} von E.coli IB 5 sowohl durch fällbares Protein als auch durch die endogene tRNA von E.coli CP 79 beeinflußt werden kann. Ob die gesamte endogene tRNA, nur die Elongations-tRNAs oder nur die Initiations-tRNAs die Methylierungsreaktion der tRNA^{fMet} von E.coli IB 5 hemmen, konnte nicht mehr mit Enzymextrakten, sondern nur mit der gereinigten Methylase getestet werden.

Die reine tRNA-Uracil-5-Methyltransferase wurde für die weiteren Untersuchungen freundlicherweise von G. Björk, Umea Schweden, zur Verfügung gestellt.

Abb. 15 Methylierung I-defizienter Initiations-tRNAs mit verschieden aufbereiteten S-100 Extrakten aus E.coli CP 79



eingesetzt wurden je 0.1 A₂₆₀ tRNA^{fMet} von E.coli IB 5, und je 250 ug von E.coli CP 79 Extrakt. Durchführung der Methylierung siehe 3.6.3.

- 4.3.2 Methylierung mit einer reinen tRNA-Uracil-5
 Methyltransferase
- 4.3.2.1 Einfluß von Initiationsfaktor IF-2 auf die
 Methylierungsreaktion

Die Initiations-tRNA ist die einzige tRNA, die nicht mit dem Proteinfaktor EF-Tu, sondern mit dem Initiationsfaktor IF-2 im Komplex mit GTP an das Ribosom bindet.

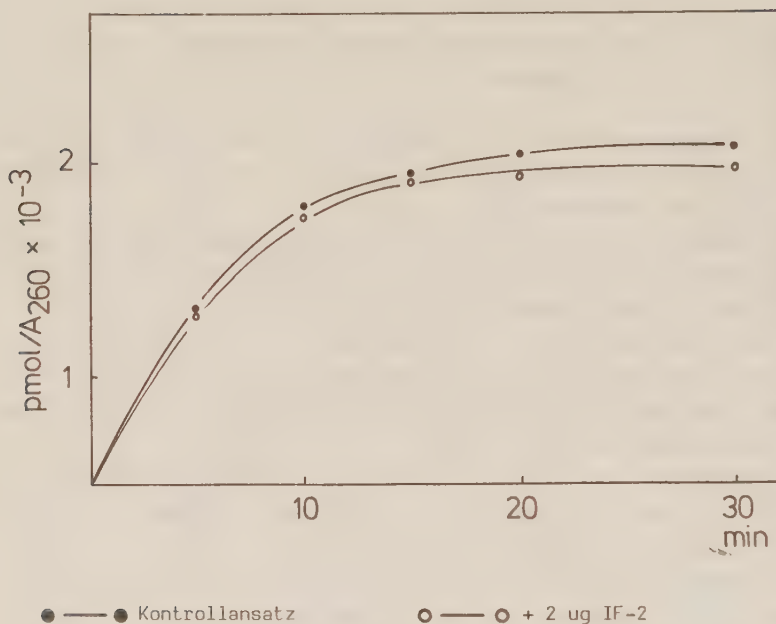
Es existieren E.coli Mutanten, die partiell an Position 54 der tRNA untermodifiziert sind und einen um das zwei- bis dreifach erhöhten Gehalt an IF-2 haben (Baumstark et al., 1977).

Da die Methylierung der Initiations-tRNA durch fällbares Protein beeinflusst werden konnte, IF-2 möglicherweise auch in E.coli CP 79 vermehrt gebildet wird, sollte der Einfluß dieses Initiationsfaktors auf die Methylierung überprüft werden.

Dazu wurde die tRNA^{fMet} von E.coli IB 5 mit reiner m⁵U-Methylase in Anwesenheit von IF-2 mit ¹⁴C-SAM methyliert. IF-2 war in einer Konzentration von 2 µg Protein im Ansatz enthalten.

Abb. 16 zeigt, daß der Zusatz von IF-2 zum Methylierungsansatz mit reinem Enzym keine Hemmung ergibt. Verdoppelung der Konzentration an IF-2 im Ansatz zeigte ebenfalls keine Veränderung.

Abb. 16 Methylierung von T-defizienter tRNA^{fMet} in Gegenwart von IF-2 und gereinigter m⁵U-Methylase



Der Methylierungsansatz enthält je 0.1 A₂₆₀ tRNA^{fMet} von E.coli IB 5; 2 µg Initiationsfaktor IF-2. Die Uracil-5-methyltransferase wurde 1:1000 verdünnt verwendet. Die Methylierung wurde analog 3.6.3 durchgeführt.

4.3.2.2 Hemmung der Methylierung von T-defizienter Initiations-tRNA durch Elongations-tRNAs

Die Hemmung der Methylierungsreaktion mit Rohextrakt von E.coli CP 79 konnte nicht nur durch Ammoniumsulfatfällung, sondern auch durch Entfernen der endogenen tRNA aus dem Extrakt aufgehoben werden.

Die Initiations-tRNA von E.coli IB 5 wurde mit reiner m⁵U-Methylase vollständig nachmethyliert. Den Einfluß von Gesamt-tRNA auf die Methylierung der Initiations-tRNA mit reiner tRNA (Uracil-5) Methyltransferase sollte geprüft werden.

Um auszuschließen, daß die zugesetzte tRNA selbst methyliert wird, wurde tRNA von E.coli MRE 600 verwendet. Diese tRNA hat Ribosylthymine und ist somit kein Substrat mehr für die m⁵U-Methylase.

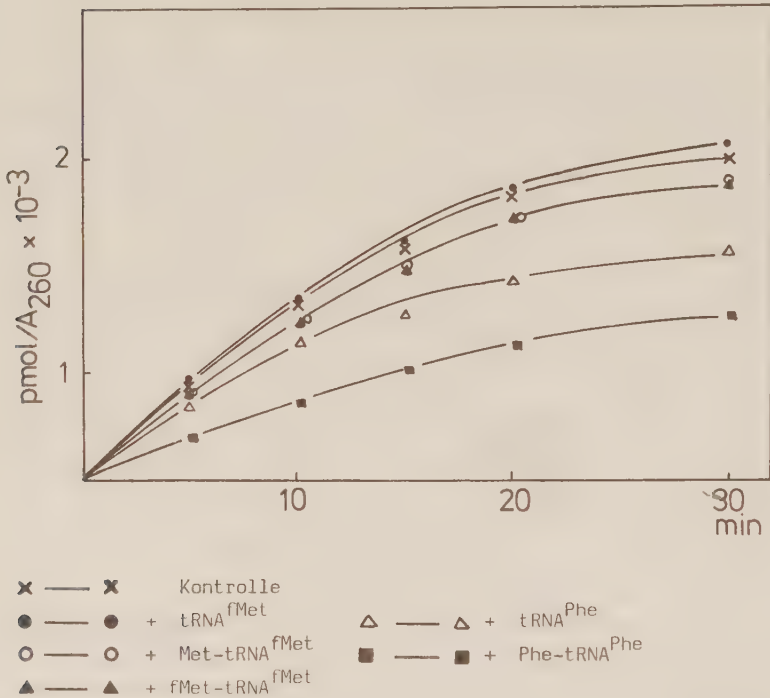
Zunächst wurde eine mögliche Konkurrenz der tRNA^{fMet} (U54) von E.coli IB 5 mit tRNA^{fMet} (T54) aus E.coli MRE 600 überprüft. Die tRNA^{fMet} (T54) wurde dazu i) unbeladen, ii) aminoacyliert und iii) aminoacyliert und formyliert dem Methylierungsansatz zugesetzt. Weder unbeladen, noch aminoacyliert, noch aminoacyliert und formyliert hemmte tRNA^{fMet} (T54) die Methylierung von tRNA^{fMet} (U54) (Abb. 17).

Deshalb wurde als nächstes Elongations-tRNA (tRNA^{Phe}) von E.coli MRE 600 in Konkurrenz zur tRNA^{fMet} U54 eingesetzt.

Die tRNA^{Phe} wurde i) unbeladen und ii) aminoacyliert dem Methylierungsansatz zugesetzt. In beiden Fällen hemmte die tRNA^{Phe} T54 die Methylierung von tRNA^{fMet} U54 partiell (Abb. 17).

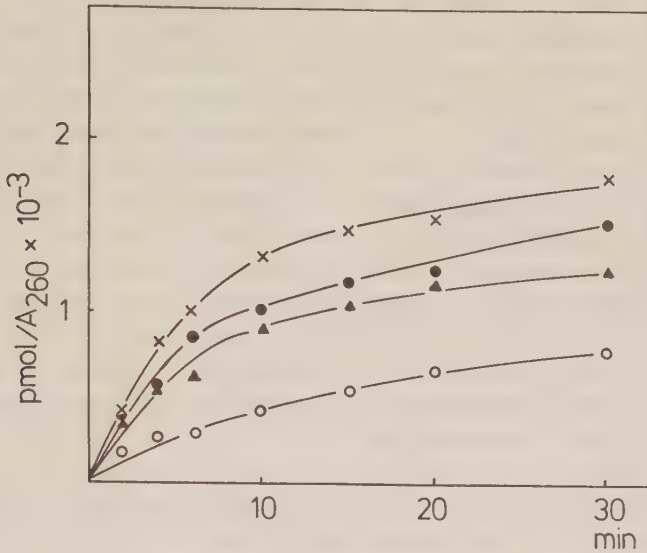
Im folgenden Versuch wurde die tRNA^{Phe} in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (Abb. 18).

Abb. 17 Methylierung von T-defizienter Initiations-tRNA in
Gegenwart von Initiations-tRNA T54 oder
Elongations-tRNA T54



Der Methylierungsansatz enthält je 0.2 A₂₆₀ tRNA^{fMet} von E.coli IB 5. Zugesezt wurden 0.2 A₂₆₀ tRNA^{fMet} von E.coli MRE 600 bzw. 0.2 A₂₆₀ tRNA^{Phe}. Die tRNAs von E.coli MRE 600 wurden i) unbeladen, ii) aminoacyliert und iii) aminoacyliert und formyliert eingesetzt (siehe Symbole). Die Konzentration der Uracil-5-methyltransferase betrug 1:1000.

Abb. 18 Methylierung von T-defizienter Initiations-tRNA
in Gegenwart von Elongations-tRNA T54



- x — x Kontrolle
 ● — ● + 0.05 A₂₆₀ tRNA^{Phe} T54
 ▲ — ▲ + 0.2 A₂₆₀ tRNA^{Phe} T54
 ○ — ○ + 0.4 A₂₆₀ tRNA^{Phe} T54

Der Methylierungsansatz enthielt 0.2 A₂₆₀ tRNA^{fMet} von E.coli IB 5; die Uracil-5-Methyltransferase wurde 1 : 1 000 verdünnt) verwendet. Zugesezte Konzentration an tRNA^{Phe} von E.coli MRE 600 siehe Symbole.

Wie im Kapitel 4.2.7 beschrieben kommen in E.coli IB 5 zwei Formen der Initiations-tRNA mit gleicher Sequenz vor. Eine Form enthält kein s⁴U an Position 8. Die beiden Formen der tRNA^{fMet} könnten unterschiedliche Affinität zur m⁵U-Methylase haben und daher unterschiedlich durch tRNA^{Phe} gehemmt werden.

5. Diskussion

Ribosylthymine kommt in allen Prokaryonten an Position 54 der tRNA vor. Der Biosyntheseweg von Ribosylthymine unterscheidet sich bei den gram-positiven und den gram-negativen Prokaryonten. Bei *Bacillus subtilis* (gram-positiv) wird die Methylgruppe vom Serin über eine Tetrahydrofolat-abhängige tRNA-Methyltransferase auf U54 aller tRNA-Species übertragen (Schmidt, Arnold, Kersten, 1977; Arnold et al., 1975). Bei *E. coli* (gram-negativ) stammt die Methylgruppe vom Methionin, die Methylierungsreaktion wird von einer S-Adenosylmethionin abhängigen Methyltransferase katalysiert (Mandel und Borek, 1963; Kerr et al., 1973).

Die hohe Konservierung des T ψ C-loops in der tRNA legt nahe, daß dieser Bereich der tRNA eine wesentliche Rolle spielt bei den Funktionen der tRNA während der Proteinbiosynthese.

Bisher konnte für Initiations-tRNA und einige Elongations-tRNAs gezeigt werden, daß sich die Methylierung von Uridin an Position 54 der tRNA stabilisierend auf die Struktur auswirkt - U-haltige tRNA hat einen niedrigeren Schmelzpunkt als T-haltige. Untersucht wurde dieses Schmelzverhalten an tRNA^{Lys}, tRNA^{Phe} (Albani, 1979) und tRNA^{fMet} (Davanloo et al., 1979).

Die Bindung der tRNA in die ribosomale A-Seite des Ribosoms wird von der Methylgruppe an Position 54 ebenfalls beeinflusst. Für tRNA^{Lys} wurde gefunden, daß Ribosylthymine die Bindung der tRNA^{Lys} im Komplex mit EF-Tu und GTP in die A-Seite erniedrigt. Die Translationsrate im Poly(A) codierten System ist für tRNA^{Lys} T54 erniedrigt, verglichen mit der tRNA^{Lys} U54 (Kersten et al., 1981). Dagegen wird bei der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese mit tRNA^{Phe} die Translationsrate erhöht, wenn die tRNA methyliert ist (Praisler et al., 1981).

Bei den Eukaryonten gibt es verschiedene tRNA-Klassen (Roe et al., 1976). Für tRNAs der Hauptklasse, die abhängig vom metabolischen Zustand und bei Vertebraten abhängig vom Gewebe variierende Mengen von T54 und U54 in einer tRNA-Species enthalten, wirkt sich eine vollständige Methylierung positiv auf die Proteinbiosynthese aus (Roe und Tsen, 1977). Wird dagegen tRNA aus der Klasse D nachmethyliert, bei der an Position 54 ausschließlich Uridin vorkommt, so sind diese tRNAs in zellfreien Systemen der Proteinbiosynthese mit natürlicher oder künstlicher Messenger RNA weniger effizient (Marcu und Dudock, 1976).

Für den Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* wurde gefunden, daß bei der Proteinsynthese bevorzugt T-haltige tRNAs verwendet werden (Dingermann et al., 1980). tRNA T-54 findet man dabei vor allem an den Polysomen assoziiert, während tRNA U-54 an freien Ribosomen, im Cytosol und im Zellkern vorkommt (Dissertation Pistel, 1982).

Diese zum Teil unterschiedlichen Auswirkungen des Ribosylthymins in zellfreien Proteinbiosynthesystemen bei verschiedenen tRNA-Species und die unterschiedliche Verteilung U54- und T54-haltiger tRNAs in Eukaryonten zeigen, daß das modifizierte Nukleosid eine Rolle bei der Modulation des Proteinbiosyntheseapparates spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte im ersten Teil gezeigt werden, daß Ribosylthymine in tRNA^{Leu} und tRNA^{Phe} in zellfreien Translationssystemen die Genauigkeit und die Geschwindigkeit der Translation beeinflusst. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle dieser Nukleoside in Initiations-tRNAs bei der Initiation untersucht.

A. Ribosylthymine, Elongation und Genauigkeit der Proteinsynthese

Im polyaminabhängigen optimierten Homopeptidsynthesystem ist die Geschwindigkeit der Elongation mit tRNA^{Phe} T-54 erhöht gegenüber tRNA^{Phe} U-54. Sind sowohl T54- als auch U54-haltige tRNAs in einem Ansatz gemeinsam vorhanden, so steigt die Translationseffizienz mit steigendem Anteil der T54-haltigen tRNA.

Bei eukaryontischen tRNAs der Hauptklasse C, bei denen das Verhältnis von U54/T54 in einer tRNA-Species vom metabolischen Zustand der Zellen und bei Säugetieren vom Gewebe abhängig ist, ist die Elongationsrate bei der Proteinsynthese ebenfalls abhängig vom Ribosylthyminegehalt der tRNA (Roe et al., 1977),

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Methylgruppe an Position 54 der tRNA^{Phe} und tRNA^{Leu} einen deutlichen Einfluß auf die Genauigkeit der Proteinsynthese hat. Der Einbau von Leucin in Polyphenylalanin steigt von 1 in 10 000 für T-haltige Gesamt-tRNA auf 1 in 1 000 bei Verwendung von U-haltiger Gesamt-tRNA.

Wie kann sich eine Basenmodifikation entfernt vom Anticodon so stark auf die Genauigkeit der Anticodonerkennung auswirken?

Bei der Translation einer Messenger RNA wird die tRNA zunächst in die A-Seite des Ribosoms gebunden. Durch Codon-Anticodon-Wechselwirkung mit der mRNA erfolgt eine Konformationsänderung der tRNA. Dadurch wird die TΨC-Sequenz besser zugänglich (Schwarz et al., 1974 und 1976; Gassen, 1980). Die Basenfolge GTΨC kann nun an ribosomale RNA binden, wodurch die Bindung der tRNA in die A-Seite irreversibel wird (Erdmann et al., 1980).

Die Diskriminierung zwischen "richtiger" und "falscher" tRNA erfolgt nach Stärke und Anzahl der möglichen Basenpaarungen zwischen Codon und Anticodon. Diese Bindungsenergie beeinflusst die Geschwindigkeit, mit der eine tRNA vom Codon wieder abdiffundieren kann.

Da für die U-haltige tRNA^{Phe} die Bindung in die ribosomale A-Seite erniedrigt ist, kann auch die "richtige" tRNA schneller wieder vom Ribosom abdiffundieren, wodurch die Zeit zur Überprüfung des Anticodons verkürzt wird und die Fehlerhäufigkeit steigen kann.

Ein Modell, das auf den unterschiedlichen Energieausbeuten für die Bindung von $\text{T}\Psi\text{CG}$ bzw. $\text{U}\Psi\text{CG}$ an eine homologe Sequenz der rRNA, sowie auf den verschiedenen Basenpaarungsenergien für tRNA^{Phe} und tRNA^{Leu} beruht, ist in der Dissertation Ott (1984) beschrieben. An Hand dieses Modells konnte der Unterschied für die Fehlerrate mit U- und T-haltiger tRNA^{Leu} errechnet werden.

Um eine "falsche" Codon-Anticodon-Wechselwirkung zu ermöglichen, muß die Anzahl der möglichen Basenpaarungen groß genug sein. Von den fünf Leucin-tRNA-Isoakzeptoren können deshalb nicht alle in gleicher Weise an einem Fehleinbau von Leucin in Polyphenylalanin beteiligt sein. $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_4$ -Isoakzeptor (Anticodon XAA) unterscheidet sich nur in der dritten Base des Anticodons vom Anticodon der tRNA^{Phe} und erlaubt so noch genügend Basenpaarung, um einen Fehleinbau von Leucin zu ermöglichen. Daß tatsächlich nur dieser eine tRNA^{Leu} -Isoakzeptor für den Fehleinbau verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die höchste Fehlerrate ergab sich, wenn beide Partner, tRNA^{Phe} und $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_4$, untermodifiziert waren. Das Kreuzexperiment ergab, daß bei gemischter Verwendung (tRNA^{Phe} T-54 und $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_4$ U-54 bzw. tRNA^{Phe} U-54 und $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_4$ T-54) die Fehleinbaurate wieder erniedrigt war. tRNA^{Phe} und $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_4$ scheinen zwei verschiedenen Species von tRNA anzugehören, da sich das Fehlen der Methylgruppe unterschiedlich auf ihre Translationseffizienz im Poly(U)System auswirkt: mit tRNA^{Phe} U-54 wird weniger Polyphenylalanin gebildet, mit $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_4$ U-54 wird mehr Leucin "falsch" eingebaut.

Daß verschiedene tRNAs durch die Methylierung von Uridin verschieden beeinflußt werden, war schon durch den Vergleich von tRNA^{Lys} und tRNA^{Phe} im jeweiligen Homo-peptidsynthesystem gezeigt worden.

Inwieweit die Ergebnisse aus artifiziellen "in vitro" Systemen auf ihre Bedeutung "in vivo" übertragen werden können, muß dahin gestellt bleiben.

Daß Ribosylthymidin "in vivo" einen Vorteil für den Organismus darstellt, zeigt das Experiment von Björk (1971). Dabei überwächst der I-haltige Wildtyp die U-haltige Mutante nach einigen Generationen. Ob dies durch den Vorteil eines schnelleren und genaueren Elongationszyklusses des I-haltigen Stammes bedingt ist, kann nicht entschieden werden.

B. Ribosylthymidin, Initiation und Regulation der Proteinsynthese

Die Proteinsynthese bei Prokaryonten startet normalerweise mit tRNA^{fMet}, wobei diese an der Aminogruppe des Methionins formyliert ist (fMet-tRNA^{fMet}). Eukaryonten dagegen initiieren mit unformylierter Initiations-tRNA.

Die Formylierung der Initiations-tRNA und die Biosynthese von Ribosylthymidin sind bei gram-positiven Prokaryonten dadurch gekoppelt, daß beide Prozesse vom gleichen Coenzym, dem Tetrahydrofolat abhängig sind (Arnold et al., 1975).

Folatabhängiger *Streptococcus faecalis* startet die Proteinsynthese mit fMet-tRNA^{fMet}, wenn er in folathaltigem Medium gewachsen war. In folatfreiem Medium gewachsen, wird unformyliert initiiert. Die Initiations-tRNA hat unter den folatfreien Wachstumsbedingungen kein Ribosylthymidin an Position 54 der tRNA (Rabinowitz et al., 1974).

Trimethoprim ist ein Inhibitor der Folatreduktase. Wächst *Bacillus subtilis* (gram-positiv) in Trimethoprim-haltigem Medium, das alle folatabhängigen Metaboliten enthält, so wird ebenfalls mit unformylierter Initiations-tRNA die Proteinsynthese gestartet. Die Biosynthese von Ribosylthymidin wird dabei ebenfalls gehemmt, so daß die tRNA^{fMet} U-54 statt I-54 enthält (Arnold et al., 1977).

Es scheint also, daß durch den Ersatz von Ribosylthymine in der tRNA durch Uridin die Initiation der Proteinsynthese auch unformyliert ermöglicht wird.

Bei gram-negativen Prokaryonten wird die Methylgruppe durch eine S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase übertragen, sodaß die Biosynthese von Ribosylthymine und die Formylierung der Initiations-tRNA entkoppelt sind.

Da Prokaryonten polycistronische Messenger haben, müssen interne AUG-Codons von Startcodons weiterer Cistrons unterschieden werden können.

Die Initiation des ersten Cistrons erfolgt an der 30S ribosomalen Untereinheit und ist unabhängig von der Formylierung der Initiations-tRNA. Bei den folgenden Cistrons wird mit undissoziierten 70S Ribosomen initiiert, wobei die tRNA^{fMet} formyliert sein muß. Grunberg-Manago diskutiert, daß zwei Konformationen von 70S Ribosomen möglich sind: eine Hauptform, die in der Proteinsynthese inaktiv ist und die formylierte Initiations-tRNA nicht binden kann, und eine zweite Form von 70S Ribosomen, die aktiv bei der Initiation ist und nur die formylierte fMet-tRNA^{fMet} bindet. Die Formylgruppe hätte in diesem Modell die Funktion, zwischen aktiven und nicht aktiven 70S Ribosomen zu unterscheiden.

Bei der Translation polycistronischer MS2 Phagen RNA wurde gefunden, daß aminosäureauxotrophe E.coli Mutanten mit unformylierter tRNA auch dann initiieren können, wenn diese Mutanten das I-bildende Enzym besitzen (Dissertation Männlein, 1983).

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß diese E.coli Stämme eine zweite Form der Initiations-tRNA enthalten. Die spezifische tRNA^{fMet} von E.coli CP 79 (I-54) (Aminoacylierungsaktivität 1 100 pmol/A₂₆₀) konnte mit SAM mit 500 pmol CH₃/A₂₆₀ tRNA methyliert werden. Das

gebildete Produkt der Methylierung war Ribosylthymine, wie durch HPLC- und DC-Analyse gezeigt werden konnte. Die Analyse dieser tRNA^{fMet}₂ durch Kuchino (Japan) ergab, daß eine weitere Modifikation an Position 8 der tRNA fehlt. Die tRNA^{fMet}₂ hat hier ein Uridin statt s⁴U.

Die Translation der MS2 Phagen RNA war mit unformylierter Initiations-tRNA dann am effizientesten, wenn beide Initiations-tRNAs (tRNA^{fMet}₁ und tRNA^{fMet}₂) vorhanden waren und die Elongations-tRNAs Ribosylthymine enthielten.

In auxotrophen E.coli Stämmen setzt bei Aminosäuremangel ein Regulationsprozeß ein, die sogenannte "stringent control" (Travers et al., 1976). Verantwortlich dafür ist das relA Gen, das die Synthese von tRNA, rRNA und einigen mRNAs in Abhängigkeit von der Proteinsynthese reguliert. Dabei werden die seltenen Nukleotide ppGpp und pppGpp synthetisiert. Ausgelöst wird die Synthese von ppGpp durch den "stringent" Faktor, einem Enzym, dessen Synthese durch den Komplex mRNA x Ribosom x unbeladene tRNA induziert wird. Das Fragment T⁴CG allein kann ebenfalls die "stringent response" auslösen (Richter et al., 1974). Das Enzym tRNA-Uracil-5-Methyltransferase ist diesem Regulationssystem unterworfen (Ny et al., 1980), wohingegen verschiedene andere Methylierungsenzyme nicht stringent kontrolliert sind.

Die Initiations-tRNAs von E.coli IB 5 (U) können mit gereinigter Uracil-5-Methyltransferase und SAM vollständig methyliert werden.

Diese Methylierungsreaktion kann durch Zugabe von T-haltiger Elongations-tRNA gehemmt werden, abhängig von der Konzentration der zugesetzten tRNA^{Phe}.

Zugabe von T-haltiger Initiations-tRNA beeinflußt die Methylierungsreaktion nicht. Dies könnte bedeuten, daß Initiations- und Elongations-tRNAs verschiedene Affinität zur Methylase haben. Initiations-tRNAs haben eine andere Konformation als Elongations-tRNAs. Möglicherweise ist das Fehlen von s⁴U an Position 8 der tRNA^{fMet}₂ an der Erkennung dieser tRNA durch die Methylase von Bedeutung, da die Konformation

dieser tRNA noch weiter verändert sein kann. Durch diese unterschiedliche Affinität der Initiations- bzw. der Elongations-tRNAs zum Enzym könnte unter Mangelbedingungen gewährleistet werden, daß die Elongations-tRNAs vorwiegend methyliert werden, aber Initiations-tRNAs mit U an Stelle von T auftreten. Somit könnte die Initiation einiger mRNAs durch unformylierte U-haltige tRNA₂^{fMet} aufrecht gehalten werden.

Ein anderer Regulationsmechanismus der Zelle, der durch die Initiations-tRNA beeinflusst wird, wurde von Debenham beschrieben (1980). Wird die Proteinsynthese erniedrigt, so sinkt die Initiationsrate, wodurch sich fMet-tRNA^{fMet} in der Zelle anreichern kann. Diese formylierte, beladene tRNA^{fMet} bindet an die RNA-Polymerase und ändert deren Promotorspezifität (Pongs, 1976). Die Synthese ribosomaler Proteine und RNA wird erniedrigt, während mehr nicht ribosomale Proteine gebildet werden. Da nur die formylierte Initiations-tRNA an die Polymerase bindet, kann bei Folatmangel dieser Effekt nicht auftreten, jedoch könnte durch die tRNA₂^{fMet}(U) die Translation einiger mRNAs fortgesetzt werden.

Bei Aminosäuremangelbedingungen könnten demnach zwei gegenläufige Regulationsmechanismen auftreten:

- a. durch ppGpp wird auf der Transkriptionsebene die Synthese von rRNA, tRNA und einiger mRNAs gehemmt,
- b. durch unformylierte untermodifizierte tRNA₂^{fMet} können noch einige mRNAs translatiert werden, wodurch die Zelle sich an veränderte Umweltbedingungen anpassen kann.

Abraham, A.K. und Pihl, A. (1980)

Eur.J.Biochem. 106, 257-262

Agris, P.F., Koh, H. und Söll, D. (1973)

Arch.Biochem.Biophys. 154, 277-282

Albani, M., Schmidt, W., Kersten, H., Geibel, K. und Lüderwald, J. (1976)

FEBS Lett. 70, 37-42

Albani, M. (1979)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Algranati, J.D. und Goldemberg, S.H. (1977)

Biochem.Biophys.Res.Comm. 75, 1045-1051

Ames, B. und Dubin, D. (1960)

J.Biol.Chem. 235, 769-757

Arnold, H.H. und Kersten, H. (1975)

FEBS Lett. 53, 258-261

Arnold, H.H. (1977)

Biochim.Biophys.Acta 476, 76-87

Aschhoff, H.J., Elten, H., Arnold, H.H., Mahal, G., Kersten, W.

und Kersten, H. (1976)

Nucleic Acid Res. 3, 3109-3122

Atkins, J.F., Lewis, J.B., Anderson, C.W. und Gesteland, R.F. (1975)

J.Biol.Chem. 250, 5688-5695

Avital, S. und Elson, D. (1969)

Biochim.Biophys.Acta 179, 297-307

Baumstark, B.R., Sprenulli, L.L. RajBhandary, U.L. und Brown, G.M. (1977)
J.Bacteriol. 129, 457-471

Berg, P., Bergmann, F.H., Ofengand, E.J. und Dieckmann, M. (1961)
J.Biol.Chem. 236, 1726-1736

Björk, G.R. und Isaksson, L.A. (1970)
J.Mol.Biol. 51, 83-100

Björk, G.R. und Neidhardt, F.C. (1971)
Cancer Res. 31, 706-709

Björk, G.R. (1983)
in: Processing of RNA, Ed. Apirion, D. CRC Press

Brisoe, W.T., Griffin, A.C., McBride, C. und Bowen, T.M. (1975)
Cancer Res. 75, 2586-2593

Clark, B.F.C. (1978)
in: Transfer-RNA ed. S. Altman, Cell Monographie Series
The MIT Press, Cambridge, Mass. and London, England S. 14

Cohen, S., Morgan, S. und Streibel, E. (1969)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 64, 669-672

Crick, F.H.C. (1966)
J.Mol.Biol. 19, 548-555

Darvaloo, P., Sprinzl, M., Watanabe, K. Albani, M. und Kersten, H. (1979)
Nucl.Acid Res., 6, 1571-1581

Davis, G., Gehrke, C. und Kuo, K. (1979)
J.Chrom. 173, 281-298

Debenham, P.G., Pongs, O. und Travers, A.A. (1980)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 870-874

Dingermann, T., Schmidt, W. und Kersten, H. (1977)
FEBS Lett. 80, 205-208

Dingermann, T., Pistel, F. und Kersten, H. (1980)
Eur.J.Biochem. 104, 33-40

Doctor, B.P., Wagman, B.J., Cory, S., Rudland, P.S. und Clark, B.F.C. (1969)
Eur.J.Biochem. 8, 93-100

Dohme, F. und Nierhaus, K.H. (1976)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 2221-2225

Doi, R.H. (1971)
in: Protein Biosynthesis in Bacterial Systems,
 (Laskin, A.I. und Last, J.A., eds.) Vol 1, 68-88
 Marcel Dekker Verlag, N.Y.

Dube, S.K., Marcker, K.A., Clark, B.F.C. und Cory, S. (1968)
Nature 218, 232

Erdmann, V., Sprinzl, M., Richter, D. und Lorenz, S. (1974)
Acta biol.med.germ. Band 33, 605-608

Erdmann, V.A., Appel, B., Digweed, M., Kluwe, D., Lorenz, S., Lück, A.,
Schreiber, A., Schuster, L. (1980)
in: Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes
 (Osawa, S., Ozeki, H., Urida, H. und Yura, T., eds.) S 553-563
 Elsevier North-Holland, Amsterdam

Fradin, A., Gruhl, H. und Feldmann, H. (1975)
FEBS Lett. 50, 185-189

Gassen, H.G. (1980)

Progr.Nucleic.Acid Res.Mol.Biol. 24, 57-82

Gavrilova, L.P. und Rutkevitch, N.M. (1980)

FEBS Lett. 120, 135-140

Gosh, H.P., Gosh, K., Simsek, M., RajBhandary, L. (1982)

Nucl.Acid.Res. 10, 3241-3247

Gray, M.W. und Spencer, D.F. (1983)

FEBS Lett. 161, 323-327

Grosjean, H., Ballivan, L., de Henau, S. und Bollen, A. (1979)

Archives Internationales de Physiologie et de Biochemie 87, 415-417

Henshaw (1979)

in: Methods of Enzymology 60, 3-11

Hunter, A.R., Farrell, P.J., Jackson, R.J. und Hunt, T. (1977)

Eur.J.Biochem. 75, 149-157

Igarashi, K., Matsuo, Y., Mitsui, K. und Hirose, S. (1980)

Biochem.Biophys.Res.Comm. 93, 360-368

Jelenc, P.C. und Kurland, C.G. (1979)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 3174-3178

Katze, J.R. (1975)

Biochim.Biophys.Acta 383, 131-139

Kay, J.E. und Benzie, C.R. (1980)

FEBS Lett. 121, 309-312

Kerr, J.S. und Borek, E. (1973)

in: Enzymic Methylation of Natural Polynukleotides
(Boyer, B.T., ed.) S.167, The Enzymes Vol 9,
Academic Press Inc. N.Y.

Kersten, H., Sandig, L. und Arnold, H.H. (1975)

FEBS Lett. 55, 57-60

Kersten, H., Albani, M., Männlein, E., Praisler, R., Wurmbach, P.
und Nierhaus, K.H. (1981)

Eur.J.Biochem. 114, 451-456

Kersten, H. (1982)

in: Biochemistry of Adenosylmethionine and Related Compounds,
Mc Millan Press

Kersten, H. (1984)

Progr.Nucl.Acid Res.Mol.Biol. (im Druck)

Kim, S.H. (1978)

in: Transfer-RNA ed. S. Altman, Cell Monographie Series

The MIT Press, Cambridge, Mass. and London, England S. 248-293

Kleimann, L., Heron, T., Essagian, C., Nicoghossian, K., und
Cedergren, R.J. (1983)

Nucleic Acids Res. 11, 2585

Mach, M. (1981)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Männlein, E. (1983)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Mandel, C.R. und Borek, E. (1963)

Biochem. 2, 555-560

Mans, R.L. und Novelli, G.D. (1961)

Arch.Biochem.Biophys. 94, 48-53

Marcu, K.B. und Dudock, B.S. (1976)

Nature (London) 261, 159-162

McLaughlin, J.R., Murray, C.L. und Rabinowitz, J.C. (1981)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 4912-4916

Münch, K.H. und Berg, P. (1966)

in: Procedures in Nucleic Acid Res., ed. by G.L. Cantoni and

D.R. Davis, Harper and Row, New York, Vol 1, 375-383

Nierhaus, K.H. und Dohme, F. (1979)

in: Methods in Enzymology, LIX, 443-449

Nishimura, S. (1978)

in: Transfer-RNA ed. S.Altman Cell Monographie Series,

The MIT Press, Cambridge, Mass. and London, England S. 168-195

Nirenberg, M. und Leder, P. (1964)

Science 45, 1399-1407

Ny, T., Thomale, J., Hjalmarsson, K., Nass, G. und Björk, G.R. (1980)

Biochim.Biophys.Acta 607, 277-284

Ofengand, J. und Henes, C. (1969)

J.Biol.Chem. 244, 6241-6253

Ofengand, J. (1982)

in: Protein Synthesis in Eukaryotes

(Perez-Bercoft, R.,ed.) 1-67, Plenum Press, N.Y.

Ott, G., Praisler, R., Männlein, E. und Kersten, H. (1982)

Hoppe-Seylers Zeitschr.f.Physiol.Chemie 363, 884

Ott, G. (1984)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Pearson, R.L., Weiss, J.F. und Kelmers, A.D. (1971)

Biochim.Biophys.Acta 228, 770

Petersen, H.U., Danchin, A. und Grunberg-Manago, M. (1976)

Biochemistry 15, 1362-1369

Petersen, H.U., Joseph, E., Ullmann, A. und Danchin, A. (1978)

J.Bacteriol. 135, 453-459

Petersen, H.U., Roll, T., Grunberg-Manago, M. und Clark, B.F.C. (1979)

Biochem.Biophys.Res.Comm. 91, 1068-1074

Petrissant, G. (1973)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 1046-1049

Piper, P.W. und Clark, B.F.C. (1973)

FEBS Lett. 30, 265-267

Pistel, F. (1982)

Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg

Pongs, O., Nierhaus, K.H., Erdmann, V.A. und Wittmann, H.G. (1974)

FEBS Lett 40, suppl. S. 28-37

Praisler, R., Männlein, E., Richter, H., Ott, G. und Kersten, H. (1981)

"Regard sur la Biochimie" Societe de Chimie Biologique p. 55,
Strasbourg, France, Abstr.T.2.11

Quigley, G., Teeter, M.M. und Rich, A. (1978)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 64-68

Rabinowitz, J.C. und Samuel, C.E. (1974)

Journ.Biol.Chem. 249, 1198-1206

- Raettig, R. (1976)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Richter, D., Erdmann, V.A. und Sprinzl, M. (1974)
Acta biol.med.germ. 33, 609-611
- Roe, B.A., Michael, M. und Dudock, B. (1973)
Nature New Biol. 246, 135-139
- Roe, B.A., Chen, E.Y. und Tsen, H.Y. (1976)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 68, 1339-1347
- Roe, B.A. und Tsen, H.Y. (1977)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 3696-3700
- Schmidt, W., Arnold, H.H. und Kersten, H. (1976)
J.Bacteriol. 129, 15-21
- Schmidt, W. (1977)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Schmidt, W., Arnold, H.H. und Kersten, H. (1977)
Biochim.Biophys.Acta. 476, 76-87
- Schofield, P. und Zamecnik, P.C. (1968)
Biochim.Biophys.Acta 155, 410-416
- Schwarz, U. Menzel, H.M. und Gassen, H.G. (1976)
Biochemistry 15, 2484-2490
- Seno, T., Kobayashi, M. und Nishimura, S. (1968)
Biochim.Biophys.Acta 169, 80-94
- Shugart, L. und Stulberg, M.P. (1969)
J.Biol.Chem. 244, 2806-2808

Silberklang, M., Gillum, A.M. und RajBhandary, U.L. (1979)
in: Methods in Enzymology, 59, 58-109

Simsek, M., Ziegenmeyer, J., Heckmann, J. und RajBhandary, U.L. (1973)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 1041-1045

Singer, C.E., Smith, G.R. Cortese, R. und Ames, B.N. (1972)
Nature New Biol. 238, 72-74

Tereba, A. und McCarthy, J.B. (1973)
Biochemistry 12, 4675-4679

Thompson, R.C. und Stone, P.J. (1977)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 198-202

Traub, P. und Nomura, M. (1968)
J.Mol.Biol. 40, 391-413

Travers, A. (1976)
Molec.Gen.Genet. 147, 225-235

Vogel, H.J. und Bonner, D.M. (1956)
J.Biol.Chem. 218, 97-106

Wurmbach, P. und Nierhaus, K.H. (1979)
in: Methods of Enzymology 60, 593-606

Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Harada, F., Nishimura, S. und
McCloskey, J.A. (1980)
J.Biol.Chem. 255, 2220-2225

Yoshida, M., Takeishi, K. und Ukita, F. (1970)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 39, 852-857

Zubay, G. (1962)

J.Mol.Biol. 4, 347-356

Frau Prof.Dr.H. Kersten möchte ich danken für die Anregung zu dieser Arbeit, die stets freundliche Unterstützung und die durch ständige Diskussionsbereitschaft mögliche intensive Betreuung;

Herrn Prof.Dr.W. Kersten für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die großzügige Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit;

Herrn Prof.Dr.G. Björk, Umea, danke ich für die Überlassung der Mutantenstämme von E.coli, sowie die gereinigte tRNA-Uracil-5-Methyltransferase von E.coli;

Bei Herrn Prof.Dr.E. Schweizer möchte ich mich dafür bedanken, daß er sich zur Begutachtung meiner Arbeit bereit erklärt hat;

Herrn Prof.Dr. Kuchino danke ich für die weiterführende Analyse der Initiations-tRNAs;

Bei Frau Elke Stockhausen möchte ich mich recht herzlich für die wertvolle technische Unterstützung bei den Methylierungsversuchen bedanken. Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich bedanken für die zahlreichen Anregungen und hilfreichen Diskussionen, insbesondere bei Frau Elisabeth Männlein-Janecek.

Lebenslauf

Rosemarie Praisler

geboren am 1. April 1952 in Erlangen

Schulausbildung:

1958-1962	Volksschule Erlangen
1962-1965	Maria-Therese-Gymnasium Erlangen
1965-1971	Ohmgymnasium Erlangen
	Abitur: Juni 1971

Studium:

1971-1972	Chemie, Universität Erlangen-Nürnberg
1972-1977	Lebensmittelchemie, Universität Erlangen-Nürnberg
	1.Staatsexamen: September 1977
1978	Praktikum am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen, Nordbayern, Erlangen
	2.Staatsexamen: Dezember 1978
1979-1984	Dissertation bei Frau Prof.Dr.H. Kersten, Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen